

		Inventaris Wob-verzoek W17-07								
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.		document NTS 2017850	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Aanvraagformulier				x		x		
2		NTS initieel	x							
3		Project proposal				x			x	
4		bijlage dierproeven 1			x					
5		bijlage dierproeven 2			x					
6		bijlage dierproeven 3			x					
7		DEC advies				x		x		
8		mail startdatum				x		x		
9		Advies CCD aan bestuur		x						x
10		Beschikking				x		x		
11		aangepaste beschikking				x		x		

AVD 114022017050



Centrale Commissie Dierproeven

06 FEB. 2017

Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11400 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	64156338
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	de Boelelaan 1117
		Postbus	
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] ☐ Dhr. ☒ Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- ## 2 Over uw aanvraag

- ### 3 Over uw project

- | | | | |
|-----|--|---|---|
| 3.1 | Wat is de geplande start- en einddatum van het project? | Startdatum | 01-06-2017 |
| | | Einddatum | 01-06-2022 |
| 3.2 | Wat is de titel van het project? | De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam cellen) | |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam cellen) | |
| 3.4 | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt? | Naam DEC | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum |
| | | Postadres | [REDACTED] |
| | | | Amsterdam Nederland |
| | | E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

☐ Via een eenmalige incasso

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.

X Na ontvangst van de factuur*

* Wanneer factuur direct naar financiële afdeling VUmc dient te gaan hier een inkoopordernummer en factuuradres, graag van te voren afstemmen met financiële afdeling.

Inkoopordernummer: [REDACTED]

Factuuradres: Afdeling crediteuren, VU Medisch Centrum, p/a [REDACTED]

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

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 [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Amsterdam

Datum 31 - 01 - 2017

Handtekening [REDACTED]



Centrale Commissie Dierproeven

Melding Machtiging

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

1 Gegevens aanvrager

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

Naam van de portefeuillehouder [REDACTED]
KvK-nummer 64156338
NVWA deelnemernummer 11400

2 Gegevens gemachtigde

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

☐ KvK-nummer
☒ BSN

[REDACTED]

- 2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?

Naam gemachtigde [REDACTED]
Adres of postbus [REDACTED]
Postcode en Plaats [REDACTED] Amsterdam

☒ Dhr. ☐ Mw.

3 Inhoud machtiging

- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? ☒ Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.
☐ Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken? ☐ Ja > Ga door naar vraag 4
☐ Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u doen?
- ☒ Een projectvergunning aanvragen
 - ☒ Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
 - ☒ Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
 - ☐ Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift.
 - ☐ Alle bovenstaande opties

4 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

Naam gemachtigde

Datum

1 6 - 0 8 - 2 0 1 6

Handtekening
portefeuillehouder
van de instelling

Handtekening
gemachtigde



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- | | |
|--|--|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | <u>11400</u> |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | <u>VU Universiteit Medisch Centrum (VUMC) Amsterdam</u> |
| 1.3 Vul de titel van het project in. | <u>De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam) cellen</u> |

2 Categorie van het project

- | | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project. | <u>X Fundamenteel onderzoek</u> |
| | <u>X Translationeel of toegepast onderzoek</u> |
| <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | ☐ 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.

Leukemie is kanker van het bloed en het beenmerg en kan chronisch zijn of acuut en in dat laatste geval is een snelle behandeling nodig. **Acute myeloïde leukemie** (AML) wordt gekenmerkt door een overproductie van onrijpe witte bloedcellen. Elk jaar krijgen in Nederland ongeveer 600 mensen AML. De ziekte kan zich op elke leeftijd openbaren, maar komt vaker voor bij volwassenen in de leeftijd boven de 60 jaar. Er worden verschillende subtypes van AML onderscheiden. Elk subtype zegt iets over het type bloedcellen dat betrokken is bij de vorming van de leukemie en het stadium waarin de leukemiecellen geblokkeerd zijn in hun rijping. Informatie over het AML subtype van de patiënt biedt inzicht in het vooruitzicht (de prognose), van de patiënt en de beste manier om de patiënt te behandelen.

De standaardbehandeling van AML patiënten bestaat uit twee chemotherapie kuren die als doel hebben om de leukemie cellen te vernietigen en een complete remissie te induceren. Complete remissie is bereikt als er geen leukemie cellen in het bloed en beenmerg meer kunnen worden aangetoond met microscopisch onderzoek en als er een herstel van het aantal normale gezonde bloedcellen is bereikt. Na het bereiken van een complete remissie wordt, afhankelijk van het leukemie subtype, aanvullende therapie gegeven in de vorm van een derde chemotherapie kuur of een stamceltransplantatie. Dit om de kans op terugkeer van de leukemie te verminderen. Ondanks hoge complete remissie percentages leeft nog maar 30-40% (<60 jaar) en 10-20% (>60 jaar) van de AML patiënten vijf jaar na de diagnose. Deze extreem slechte uitkomst wordt voornamelijk veroorzaakt door overleving van een klein aantal leukemie cellen na chemotherapie (minimale restziekte) die in een slaaptoestand verkeren maar op een bepaald moment gaan uitgroeien en het recidief (terugkeer) veroorzaken. Patiënten met een AML recidief hebben een gemiddelde overleving van minder dan 6 maanden en voor de meeste van deze patiënten is op dit moment geen effectieve behandeling beschikbaar.

Een van de subtypes van AML, **acute promyelocytenleukemie** (APL), wordt niet met chemotherapie behandeld maar met all trans retinoic acid (ATRA) differentiatie therapie. APL leukemie cellen bevatten een fusie van twee chromosomen waardoor het eiwit PML-RARA aanwezig is. De aanwezigheid van dit eiwit maakt dat APL cellen goed reageren op de behandeling met ATRA. De ontdekking dat APL patiënten zeer succesvol behandeld kunnen worden met ATRA heeft er toe geleid dat APL van een fatale ziekte veranderd is in een ziekte die voor meer dan 90% van de patiënten te genezen is.

Bij diagnose is AML een heterogene populatie van leukemie cellen waarbij na de selectieve druk van de chemotherapie behandeling meestal een kleine hoeveelheid cellen blijft leven. Deze kleine chemotherapie ongevoelige subpopulatie van leukemie cellen kan vervolgens het recidief veroorzaken. Het is vaak zo dat het leukemie recidief ontstaat vanuit een kleine hoeveelheid leukemie cellen die niet zichtbaar zijn bij de diagnose van de ziekte. Dit zijn vaak leukemie cellen met stamcel kenmerken, zogenaamde leukemische stam cellen (LSCs). Om de overlevingskansen van leukemie patiënten te vergroten is het nodig om therapeutische strategieën te ontdekken en te ontwikkelen die deze chemotherapie ongevoelige AML cellen doden. LSCs zitten samen met normale gezonde stamcellen, de hematopoïetische stamcellen, in het beenmerg van de AML patiënt. Deze gezonde stamcellen groeien na therapie weer uit tot gezonde bloedcellen. Een succesvolle therapie die de LSCs elimineert zal de gezonde stamcellen moeten sparen zodat de patiënt na de therapie weer gezonde bloedcellen kan aanmaken. Hiervoor moeten we de leukemie cellen met stamcel eigenschappen karakteriseren en een beter inzicht krijgen in de kenmerken van deze cellen in elke AML patiënt. De effectiviteit en toxiciteit van nieuw ontdekte **therapieën** zal na het testen in een reageerbuis (*in vitro*) in het laboratorium, getest moeten worden in een diermodel voordat het toegepast kan worden in de patiënt.

Een van de mogelijkheden om genen geassocieerd met stamcel eigenschappen te identificeren en/of een therapie te ontwikkelen tegen LSCs waarbij gezonde stamcellen gespaard blijven is het bepalen van de differentiële expressie van genen in verschillende cel populaties. Door middel van gen expressie profilering hebben we in het verleden genen (inclusief microRNAs) geïdentificeerd die verschillend aanwezig zijn in verschillende (stam)cel populaties. De door ons geïdentificeerde genen zullen we bestuderen voor hun rol in de overleving en gevoeligheid voor therapie van leukemie cellen. Vervolgens zullen deze genen bekeken worden op hun effectiviteit als therapie doelwitten en zullen aanwezige remmers van deze genen/signaal paden, zoals nieuwe cytostatica, op genen gerichte ("targeted") therapie, chemotherapie, differentiatie therapie, "small molecules" tegen signaal moleculen, immuun therapie en recombinante eiwitten getest worden in monotherapie of in combinatie voor hun effectiviteit om leukemie cellen te doden en de gezonde cellen in leven te houden.

Chronische myeloïde leukemie (CML) begint met een chronische fase maar wanneer de patiënt niet goed

reageert op een behandeling ontstaat na verloop van tijd (meestal enkele jaren) een acute fase waarbij de uitrijping van de witte bloedcellen nog meer verstoord raakt en er in het bloed en beenmerg afwijkende cellen aanwezig zijn die de normale bloedcelproductie belemmeren. Dit leidt binnen enkele maanden tot de dood door infecties, bloedingen en ernstige bloedarmoede. In Nederland komen er per jaar 200-250 patiënten met CML bij. Bij de meeste patiënten wordt een genetische afwijking gevonden: het Philadelphia chromosoom. Dit chromosoom leidt tot productie van een eiwit (BCR-ABL) dat verantwoordelijk is voor het ontstaan van de leukemie. Sinds 10 jaar zijn er effectieve geneesmiddelen, gericht tegen het Philadelphia chromosoom, beschikbaar voor patiënten met CML. Het levenslange gebruik van deze medicijnen geeft veel bijwerkingen maar is nodig om te voorkomen dat de ziekte terug komt. De terugkeer van CML wordt, net als bij patiënten met AML, veroorzaakt door een kleine hoeveelheid leukemie cellen, LSCs, die in leven blijven na de behandeling. Deze LSCs kunnen maanden of jaren later wakker worden en de leukemie opnieuw aanwakken. Optimale therapie tegen CML moet dus ook deze LSCs uitroeien. Om therapie strategieën te ontwikkelen tegen LSCs moeten we deze cellen karakteriseren en een beter inzicht krijgen in hun kenmerken. Vervolgens is het nodig om specifieke therapieën te ontwikkelen tegen deze leukemie (stam) cellen. De effectiviteit en toxiciteit van deze nieuwe therapieën, in monotherapie of als combinatie te gebruiken, zal na het testen *in vitro*, getest moeten worden in een diermodel.

Het diermodel

Diermodellen worden gebruikt om, na het intensief testen van het geneesmiddel in het laboratorium *in vitro*, de effectiviteit van het medicijn *in vivo* te evalueren. De ontwikkeling van immunodeficiëntie muizen heeft geleid tot de mogelijkheid om geneesmiddelen tegen leukemie *in vivo* te analyseren en de effectiviteit en toxiciteit van behandelingen gericht tegen humane leukemie cellen te bepalen. Het NOD/SCID/IL2 gamma chain (NSG) knock-out muizenmodel is op het moment het meest geaccepteerde en gebruikte model om *in vivo* de aanwezigheid van normale of leukemische (stam) cellen na een behandeling vast te stellen. Er worden steeds nieuwe immunodeficiëntie muizenmodellen gemaakt die steeds beter geschikt worden voor het onderzoek naar nieuwe medicijnen tegen leukemie. Er is veel ervaring met het immuundeficiëntie muizenmodel waardoor er geen extra dieren gebruikt hoeven worden om het model te valideren. De verminderde afweer in deze dieren (afwezigheid van T en B cellen en verminderde NK cel activiteit) maakt het mogelijk om in deze dieren humane leukemie te laten uitgroeien en te bestuderen. Ook behouden de uitgegroeide humane kanker cellen in dit model de karakteristieken van de originele leukemie. Het micromilieu van het muizenbeenmerg komt in grote lijnen overeen met het micromilieu in menselijk beenmerg maar toch worden immuun-deficiënte muizenmodellen, waarbij gebruik gemaakt wordt van humane tumor groei in de muis, constant aangepast en geoptimaliseerd om ook de omgeving te humaniseren. De immuun-deficiënte muis (al dan niet aangepast met een menselijk micromilieu) is de basis voor alle experimenten gepland binnen dit project.

In dit project willen we, na het bestuderen van de functie en rol van de door ons ontdekte genen in de reageerbuis (*in vitro*), de rol van deze genen in een immuundeficiënt muizenmodel *in vivo* bestuderen en nieuwe therapieën gericht tegen deze genen testen voor hun effectiviteit in dit muizenmodel. We zullen het effect van de modulatie van genen (inclusief microRNAs) en van behandeling met nieuw ontdekte (bestaande of nieuwe) therapie, inclusief chemotherapie, differentiatie therapie, “targeted” therapie, small molecules tegen signaal moleculen, immuun therapie en recombinante eiwitten, in mono of combinatie therapie bestuderen voor het effect op de vorming van leukemie, de leukemie cel overleving en voor het effect op therapie gevoeligheid. In dit project zullen zowel leukemie cellijnen als leukemie patiënt cellen, al dan niet gemoduleerd in gen expressie, subcutaan, intraveneus of in het beenmerg van de immuun deficiënte muizen injecteren. Vervolgens zullen we na een bepaalde behandeling de uitgroei van leukemie en normale hematopoietische cellen bestuderen. Dit zal aangeven of het moduleren van gen expressie en/of het gebruik van een bepaald geneesmiddel resulteert in het verminderen van de leukemie en tegelijkertijd in het herstellen/sparen van de gezonde bloedcellen.

3.2 Doel

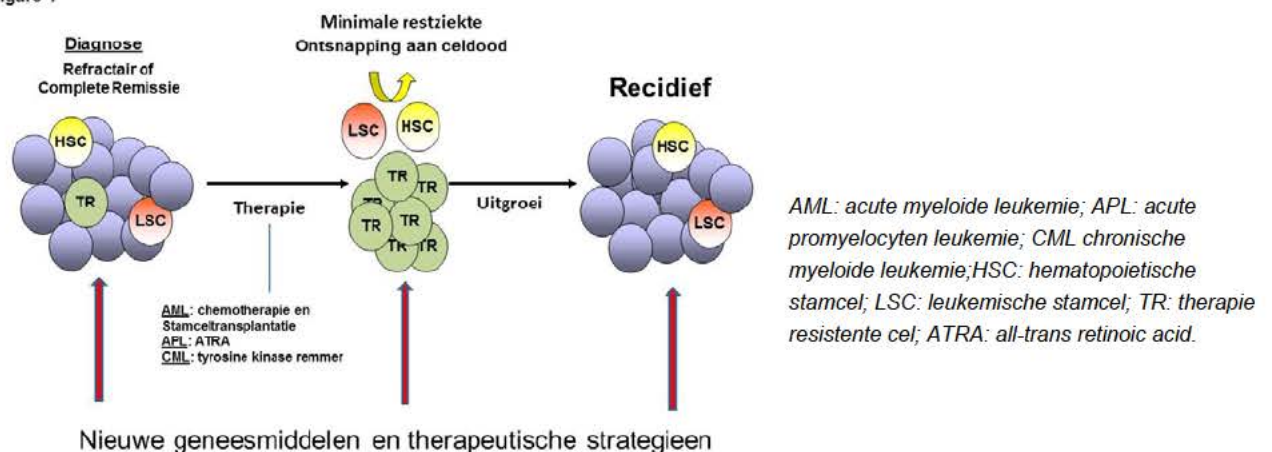
Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

Het uiteindelijke doel is om een effectief geneesmiddel en/of een effectieve therapeutische strategie te ontwikkelen om leukemie cellen in leukemie patiënten te elimineren en de terugkeer van de leukemie te voorkomen. Deze geneesmiddelen/therapeutische strategieën zullen gericht zijn tegen leukemie cellen die ongevoelig zijn voor de huidige gebruikte therapieën en zullen als mono of combinatie therapie gericht zijn tegen het elimineren van alle leukemie cellen in de patiënt. De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen die leukemie cellen doden zullen bijdragen aan betere overlevingskansen voor leukemie patiënten. Het doel van dit project zal bereikt worden door genen te testen voor hun rol in leukemie initiatie, therapie gevoeligheid, proliferatie, "zelf-vernieuwing", en differentiatie in een immuun deficiënt muis model. Vervolgens zullen we therapieën (chemotherapie, differentiatie therapie, "targeted" therapie, small molecules tegen signaal moleculen, immuun therapie en recombinante eiwitten) gericht tegen deze genen/signalerings routes in mono- of combinatie therapie preklinisch testen voor hun effectiviteit in het doden van leukemie cellen (Figuur 1).

Figure 1



Specifieke vragen die met behulp van deze dierexperimenten bestudeerd gaan worden:

Kenmerk identificatie

Wat zijn kenmerken van de cel die de overleving van cellen tijdens therapie beïnvloeden?

Wat zijn cel kenmerken die leukemie cel differentiatie en zelf-vernieuwing ("stemness") beïnvloeden?

Wat zijn cel kenmerken die leukemie cel proliferatie/quiescence beïnvloeden?

Welke kenmerken (genetisch, epigenetisch en immuunfenotypisch) van de cel en de omgeving beïnvloeden leukemie (re)-initiatie?

Therapie identificatie

Welke nieuwe therapieën zijn effectief in het elimineren van (chemotherapie ongevoelige) leukemie cellen bij diagnose, het stadium van minimale restziekte en bij recidief?

Welke therapie is effectief bij welke leukemie patiënt ("personalized" treatment)?

Haalbaarheid

De haalbaarheid van dit onderzoek is verzekerd door de volgende punten:

- De afdeling waar dit onderzoek zal plaatsvinden () heeft een grote biobank van leukemie (AML en CML) patiënten monsters (beenmerg en perifeer bloed >1500), die op alle verschillende stadia van de ziekte (diagnose, na chemotherapie en recidief) zijn afgenomen, en wordt bovendien ook constant voorzien van nieuwe patiënten monsters. De () is betrokken bij vele nationale en internationale klinische en onderzoek studies en verkrijgt daardoor vele patiënten monsters om experimenten mee uit te voeren. Van veel patiënten hebben we meer dan 100 miljoen cellen in onze biobank.
- Dit project is een voorzetting van ons eerdere *in vivo* werk in het immuun deficiënte muizen model. Dit eerdere werk heeft voor een collectie van patiënten samples gezorgd waarvan we weten dat deze een hele goede uitgroei (>15%) in de NSG muis geven en waarvan we veel ingevroren cellen hebben (>100 miljoen). Op het moment zijn we bezig om elke leukemie aanwezig in onze biobank (met veel cellen) te

testen voor uitgroei potentie in het immuun deficiënte muizen model. Dit is om er zorg voor te dragen dat we een constante voorraad van monsters hebben voor de in alle projecten lopende experimenten. We hebben gezien dat leukemie-specifieke karakteristieken zoals de aanwezigheid van oppervlakte eiwitten in de meeste gevallen stabiel blijft na injectie (transplantatie) en re-transplantatie in de muis.

- We hebben het AML xenograft NSG muizenmodel opgezet en kunnen na uitgroei in de muis goed de leukemie en de normale cellen van elkaar onderscheiden. Ook hebben we expertise in het injecteren van kleine hoeveelheden leukemie cellen in het beenmerg, de intrabeenmerg injectie, waardoor we zeer kleine opgezuiverde fracties van cellen met succes kunnen inspuiten en laten groeien.
- In het verleden hebben we de *in vivo* uitgroei potentie van AML cellen die *in vitro* gekweekt en getransduceerd zijn met virussen uitvoerig getest en zo geoptimaliseerd dat het kweken en de transductie met virale deeltjes geen invloed heeft op de potentie om in de muis uit te groeien.
- Sinds de huidige therapie voor AML patiënten uit combinatie chemotherapie en/of differentiatie therapie (ATRA voor APL patiënten) bestaat, hebben we toediening van deze beide vormen van therapie geoptimaliseerd in het NSG muizen model.
- De projectgroep omvat ervaren proefdier analisten om het project uit te voeren en [REDACTED] heeft alle technische voorzieningen en instrumentatie (zoals imaging apparatuur) om de experimenten binnen dit protocol uit te voeren.
- Het onderzoek wordt onder andere gefinancierd door [REDACTED]

Deze lopende projecten bevatten de muizen experimenten die de komende 5 jaar uitgevoerd moeten worden.

Recente publicaties met betrekking tot dit project:

[REDACTED]

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang

De resultaten van dit onderzoek zullen een bijdrage leveren aan een beter inzicht in de mechanismes die verantwoordelijk zijn voor het overleven van (stamcel-achtige) leukemie cellen na therapie en het vormen van een recidief. Dit zal vervolgens leiden tot nieuwe inzichten over de meest optimale therapie strategieën om refractaire (geen respons op therapie bij diagnose) en recidief-vormende leukemie cellen te elimineren. Omdat er vergelijkbare problemen in patiënten met andere vormen van kanker zijn, zoals de terugkeer en uitzaaiing van solide tumoren veroorzaakt door sub-klonen en kanker stamcellen, zullen de resultaten van dit project mogelijk geëxtrapoleerd kunnen worden naar andere vormen van kanker en ook de overleving en prognose van deze patiënten verbeteren. De resultaten van dit project zullen ook een beter inzicht geven over welke patiënt het beste reageert op welke therapie.

Maatschappelijk belang

Elk jaar worden in Nederland 600 patiënten met AML gediagnostiseerd. Zeventig tot 80% van de AML patiënten onder de 60 jaar reageert in eerste instantie goed op de huidige chemotherapie behandeling maar slechts 30-40% van deze patiënten overleeft vijf jaar na diagnose. Voor patiënten ouder dan 60 jaar is de prognose veel slechter en overleeft zelfs maar 10-20% vijf jaar na de diagnose. Deze slechte prognose wordt veroorzaakt doordat het merendeel van de patiënten de ziekte terug krijgt. Voor de

meeste mensen met een AML recidief is op dit moment geen behandeling beschikbaar. Het in dit project gepresenteerde onderzoek zal een belangrijke bijdrage leveren aan het ontwikkelen van nieuwe therapieën en een inzicht geven welke patiënt een respons zal hebben op welke therapie. Dit zal de prognose van deze patiënten verbeteren en zal bovendien ook een kostenbesparing opleveren omdat intensieve chemotherapie bij een recidief of een dure risicovolle stamcel transplantatie mogelijk vervangen kan worden door alternatieve succesvolle nieuwe therapie bij diagnose of na chemotherapie.

Elk jaar worden in Nederland 200-250 patiënten met CML gediagnostiseerd. In 25% van de CML patiënten werkt de behandeling gericht tegen het Philadelphia chromosoom niet en hebben de patiënten kans op ontwikkeling van een acute fase leukemie. In patiënten waarbij de behandeling wel werkt moet deze een leven lang gegeven worden. Naast de vervelende bijwerkingen zoals moeheid, spierkrampen, benauwdheid en diarree, is deze levenslange behandeling van CML patiënten heel erg duur (€30,000-60,000 per patiënt per jaar). Omdat de levensverwachting van een CML patiënt in de laatste 15 jaar flink gestegen is zijn de stijgende kosten een groot economisch probleem. De ontdekking van nieuwe therapieën tegen leukemie cellen die de CML behandeling nu overleven zal mogelijk leiden tot genezing van CML patiënten en de huidige levenslange therapie veranderen in een tijdelijke behandeling.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

In dit project willen we de potentie van door ons geïdentificeerde cel kenmerken/signaleringspaden om te dienen als therapie doelwit bestuderen en vervolgens nieuwe therapieën (mono en combinatie therapie) gericht tegen deze kenmerken testen voor effectiviteit in het elimineren van leukemie (stam) cellen in het immuun deficiënte muizen model (Figuur 1). Het uiteindelijke doel is om optimale gerichte individuele curatieve therapie te ontwikkelen voor leukemie patiënten waarbij alle leukemie cellen geëlimineerd worden en de vorming van een recidief wordt voorkomen. De uitkomsten van deze dierexperimenten zullen worden vertaald naar een klinische toepassing en zullen hopelijk bijdragen tot een significante verbetering van de overleving van leukemie patiënten.

Voordat de dierproeven gestart worden hebben we kenmerken (leukemie cel intrinsiek of aanwezig in de beenmerg omgeving) geïdentificeerd die mogelijk een rol spelen bij de ontwikkeling van een recidief. Ook hebben we voordat dierproeven gestart worden bewezen dat de geïdentificeerde kenmerken effectieve doelwitten kunnen zijn voor behandeling van leukemie met behulp van *in vitro* en *ex vivo* experimenten.

Project Flow chart (Figure 2)

Na het screenen van leukemie monsters voor hun potentie om uit te groeien in het immuun deficiënte muizenmodel (dierproef type 1 in bijlage 1) zullen we (al dan niet met een label/tag voorziende) leukemie cellen (van het diagnose, minimale restziekte of recidief stadium), die wel of niet gemoduleerd zijn in gen expressie, laten uitgroeien in immuun deficiënte muizen. Vervolgens zal de gevormde leukemie getest worden op gevoeligheid voor potentieel succesvolle nieuwe chemotherapie, differentiatie therapie, "targeted" therapie, small molecules tegen signaal moleculen en immuun therapie toegediend als mono- of combinatie therapie (dierproef 3 in bijlage 3). We verwachten geen complete nieuwe therapieën te ontdekken maar mocht dit toch zo zijn dan zullen we eerst de maximaal getolereerde dosis waarbij nog effect verwacht wordt gaan testen in het immuun deficiënte muizenmodel (dierproef 2 in bijlage 2). De functie van de omgeving (al dan niet gemanipuleerd) zullen we testen door het injecteren van stromale cellijnen, gezond donor stroma of patiënten stroma cellen of het eerst genereren van een humaan microenvironment en vervolgens inspuiten van de leukemiecellen.

Type dierproef 1: bijlage 1

Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.

We hebben een grote biobank van AML (en CML) patiënten monsters die afgenomen zijn bij elk stadium van de ziekte en we worden tevens constant voorzien van nieuwe monsters. Voor elke monster is een overeenkomst getekend in overeenstemming met de verklaring van Helsinki en een goedkeuring van de studie groep [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]. Van elk monster zijn de chromosomale afwijkingen (cytogenetica), moleculaire afwijkingen en het immuun fenotype van de aanwezige cellen bekend en ook de risicogroep waartoe het monster behoort. In dit gedeelte van het project worden leukemie cellen van leukemie patiënten getest op leukemie initiërende capaciteit (ook wel LSC activiteit genoemd) en uitgroei.

Bovendien zullen we de patiënt cel kenmerken voor en na uitgroei in de muis bekijken en vergelijken met die van de ingespoten cellen. Uit eerdere experimenten is gebleken dat voor de experimenten in bijlage 3 het beste samples gebruikt kunnen worden die meer dan 15% uitgroei hebben in de muizen. We weten uit het verleden dat het succes percentage van samples met uitgroei boven de 15% ongeveer 15% is (15% van het leukemie patiënten materiaal geeft een uitgroei boven de 15% in de immuun deficiënte muis. Dit onderdeel van het project zal zorgdragen voor een constant aanwezigheid van patiënten monsters om de experimenten binnen dit project uit te voeren.

Type dierproef 2: bijlage 2

Bepalen van de maximaal tolereerbare dosis van een nieuw medicijn in het muizen model: bepalen van toxiciteit bij dosis waarbij effect verwacht wordt.

Voordat we nieuwe therapieën, nooit eerder getest in de muis, zullen testen in het immuun deficiënte muizen model voor effect op leukemie (stam) cel eliminatie (bijlage 3) zullen we eerst de maximaal getolereerde dosering (MTD), waarbij effect te verwachten is, bepalen. We zullen een experiment doen waarbij verschillende concentraties van de nieuwe therapie geïnjecteerd worden in de muizen. Vervolgens zal het ontstaan van toxiciteit in de muizen gevolgd worden. Door middel van goed observeren zullen ziekteverschijnselen na de toediening van de therapie bekeken worden en aan het aan het einde van het experiment (tussen week 16-20) zullen de muizen opgeofferd worden en de organen (lever, darmen, hart, normale bloedcellen, beenmerg, nieren) worden bestudeerd voor afwijkende/toxiciteit verschijnselen. Ook zullen we bloedafnames doen en de concentraties van het geneesmiddel in het bloed bepalen op verschillende tijdstippen na therapie toediening.

Type dierproef 3: bijlage 3

Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen.

Met dit type dierproef hebben we de volgende doelstellingen:

1. De identificatie van kenmerken (genen) die een rol spelen bij leukemie initiatie, LSC activiteit, therapie gevoeligheid, proliferatie en differentiatie.

Of de door ons geïdentificeerde cel kenmerken (leukemie intrinsiek en/of geïnduceerd vanuit de omgeving) invloed hebben op leukemie initiatie, LSC activiteit, proliferatie, differentiatie en therapie gevoeligheid van leukemie cellen zal worden onderzocht. We zullen de expressie van cel kenmerken *in vitro* beïnvloeden in leukemie cellen (cellijnen of patiënt leukemie cellen) en vervolgens deze cellen injecteren in de muizen. De muizen zullen vervolgens wel of niet met therapie behandeld worden. Na 16-20 weken zal de uitgroei van leukemie en normale cellen in de muizen bekeken worden (Figuur 2). Omdat ongevoeligheid tegen de huidig gebruikte therapie intrinsiek kan ontstaan in leukemie cellen maar ook geïnduceerd kan zijn door het beenmerg stroma van de patiënt zullen we ook testen of het co-injecteren van beenmerg stroma (cellijnen, normaal stroma en patiënten stroma) of een humaan microenvironment eerst gegenereerd in de muis een veranderde uitgroei van de leukemie cellen veroorzaakt.

Leukemiecellen met stamcel activiteit zijn leukemie cellen die een onbeperkte mogelijkheid hebben om leukemiegroei te bevorderen en worden ook wel leukemie-initiërende cellen of leukemische stamcellen (LSCs) genoemd. De manier om de frequentie van LSCs in de leukemie te bepalen is het doen van een 1) verdunning cel transplantatie assay 2) een re-transplantatie. Bij een verdunning experiment kan vanuit de hoeveelheid cellen waarbij uitgroei plaatsvindt het aantal LSCs berekend worden en tevens het effect van de modulatie van gen expressie op de overleving van het aantal LSCs. Bij een re-transplantatie, waarbij beenmergcellen vanuit de 1^e muis waarbij reconstitutie van humane cellen heeft plaatsgevonden naar een 2^{de} muis getransplanteerd wordt, kan ook de uitgroei van LSCs aangetoond worden (Figuur 2).

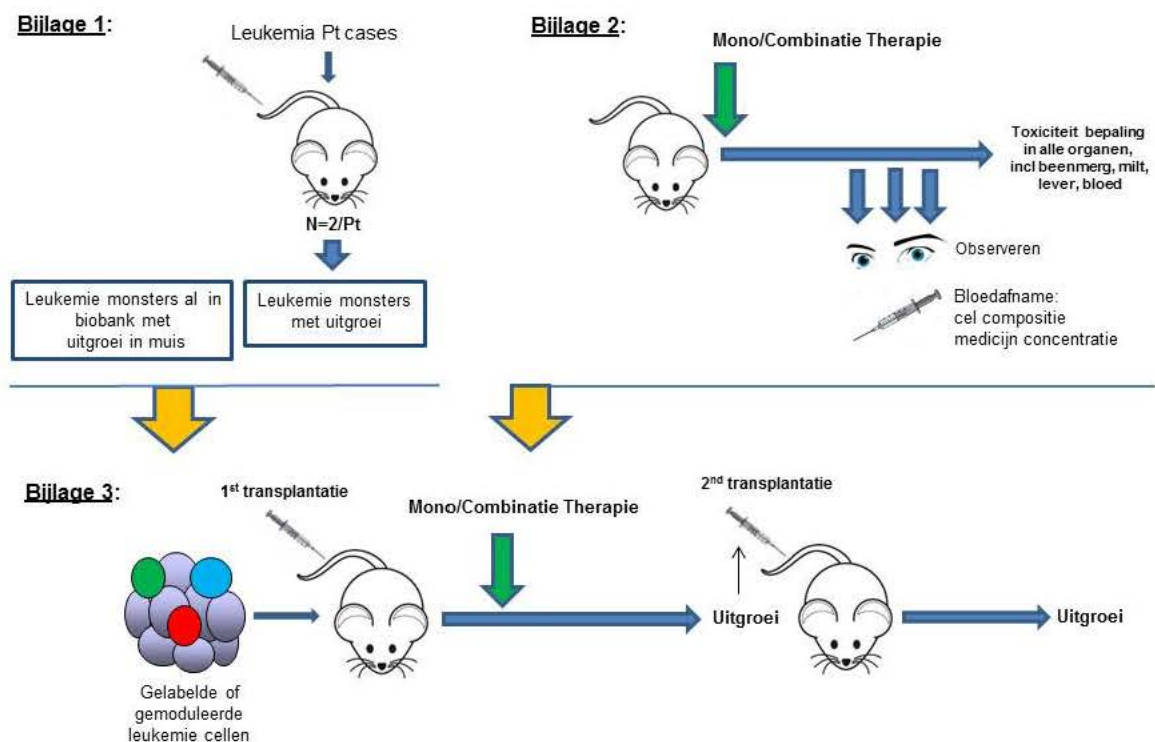
2. Het preklinisch testen van de effectiviteit van therapie tegen leukemie (sub-klonen en/of LSCs)

Het testen van bijvoorbeeld chemotherapie, differentiatie therapie, "targeted" therapie, small molecules tegen signaal moleculen en immuun therapie als monotherapie en combinatie therapie bij diagnose, minimale restziekte en het recidief stadium van de leukemie zal in de preklinische fase worden getest in de immuun deficiënte muis. Na het ontdekken van cel kenmerken die mogelijk kunnen dienen als doelwit voor therapie (zie punt 1.) zal al aanwezige therapie of nieuw ontwikkelde therapie preklinisch getest worden op effectiviteit in dit xenograft muizen model. Leukemie cellen (cellijnen of primaire patiënt cellen) zullen subcutaan of intraveneus geïnjecteerd worden in de muis en vervolgens zal de therapie worden toegepast. In sommige experimenten zullen we verschillende leukemie cel fracties (genetisch, epigenetisch of fenotypische gedefinieerd) van leukemie cellen bij diagnose een tag geven (een aminozuur tag, een

fluorescerend label, een DNA tag of een reporter die activiteit van een signalering route aangeeft) en deze fracties gecombineerd of als fractie injecteren in de muis.

Verschillende therapieën zullen vervolgens toegepast worden, wel of niet in combinatie met chemotherapie of differentiatie therapie, om te bestuderen welke cellen overleven en bij welke mono of combinatie therapie de meeste leukemie (stam) cellen dood gaan terwijl de gezonde cellen in leven blijven. Het zal om het uittesten van nieuwe cytostatica gaan maar tevens om “targeted” therapie, differentiatie therapie en immuuntherapie. Immuuntherapie zal monoclonale antilichaam en cellulaire (bijvoorbeeld CAR-T cel, cytotoxische T cel en natural killer cel therapie) therapie omvatten. Nadat de muizen met of zonder therapie behandeld zijn zal de uitgroei in het beenmerg, het bloed, de milt en de lever van de muizen bekeken worden (Figuur 2). Ook zullen we bloedafnames doen en de hoeveelheid leukemie cellen in het bloed bepalen op verschillende tijdstippen na therapie toediening. We zullen tevens de leukemie cellen die overleven karakteriseren (genetisch, epigenetisch en fenotypisch) om kenmerken te identificeren die de er voor zorgen dat deze cellen resistent tegen of gevoelig voor de gebruikte therapie zijn.

Flow chart



Figuur 2: We zullen in bijlage 1 leukiemonsters testen voor hun potentie om in een immuun deficiënt muizenmodel uit te groeien. De monsters die uitgroeien zullen we gebruiken voor het bestuderen van het effect van gen modulatie en nieuwe therapieën op leukemie (stam) cel groei in bijlage 3. Voor nieuwe therapieën nog nooit getest voor toxiciteit in een immuun deficiënt muizenmodel zullen we eerst een pilot experiment in bijlage 2 doen waarbij de toxiciteit van het geneesmiddel bij de verwachte effectieve dosis getest gaat worden.

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 onderdelen van het project en de daarbij gebruikte dierproeven

Ons doel is om effectieve geneesmiddelen te ontwikkelen die (alle) leukemie cellen bij diagnose, na therapie of bij een recidief elimineren. De ontwikkeling van deze nieuwe geneesmiddelen gericht tegen leukemie cellen zal hopelijk bijdragen tot betere overlevingskansen voor leukemie patiënten.

Type dierproef 1: bijlage 1

Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.

Leukemie cellijnen en patiënten monsters, van verschillende stadia van de ziekte (diagnose materiaal van patiënten die in complete remissie zijn gekomen of die refractair zijn (>5% leukemie in het beenmerg na therapie) waarvan we veel cellen in onze biobank hebben (>100 miljoen), patiënten cellen verkregen na 1^e, 2^e en 3^e chemotherapie kuur, patiënten cellen na een stamceltransplantatie of patiënten cellen bij een recidief) zullen geïnjecteerd (intraveneus, intra-beenmerg of subcutaan) worden in immuun deficiënte muizen. De aanwezigheid van leukemie cellen zal constant gemonitord worden door middel van bloedafname (staart afname) of bioluminescentie imaging (onder narcose) door middel van het detecteren van de met luciferase of fluorescerende eiwitten gelabelde cellen door middel van bioluminescentie imaging (onder narcose). Na maximaal 20 weken zullen het beenmerg, het bloed, de milt en de lever bestudeerd worden op aanwezigheid van humane leukemie en normale bloedcellen. Van elk ingespoten monster zijn de cytogenetica, moleculaire afwijkingen en het immuun fenotype van de cellen voor inspuiting bekend en we zullen na het uithalen van de cellen uit de immuun deficiënte muis deze kenmerken opnieuw bestuderen. Dit gedeelte van het project zal aangeven welke samples, aanwezig in onze biobank, leukemie uitgroei capaciteit hebben maar ook of de uitgegroeide cellen dezelfde kenmerken hebben als de cellen bij diagnose van de patiënt. Deze bijlage 1 zal voor een constante stroom van patiënten monsters zorgen waarmee we alle experimenten binnen dit project kunnen uitvoeren (Figuur 1, bijlage 1).

Type dierproef 2: bijlage 2

Bepalen van de maximaal tolereerbare dosis van een nieuw medicijn in het muizen model: bepalen van toxiciteit bij dosis waarbij effect verwacht wordt.

Als een nieuw geïdentificeerde therapie nog nooit in het immuun deficiënte muizenmodel getest is zullen we eerst bepalen of er toxiciteit is bij het gebruik van concentraties waarbij effect te verwachten is. We zullen behandelingsprotocollen (injectie frequentie, hoeveelheden en injectie routes) gebruiken die of al eerder gebruikt zijn in immuun deficiënte muizen met vergelijkbare medicijnen (therapie gericht tegen moleculen behorende tot dezelfde signaal transductie routes in gepubliceerde studies) of het medicijn gebruiken in concentraties die bij de patiënt verwacht worden effect te hebben. Als het geneesmiddel verwacht wordt effect te hebben in combinatie met chemotherapie of differentiatie therapie zullen we in deze bijlage de combinatie testen voor toxiciteit verschijnselen. Na toediening van de therapie zal de algemene gezondheid van de muizen bestudeerd worden. Ziekte verschijnselen zoals het verminderen van de eetlust, gewichtsverlies, lethargie, gekromde rug, geen gladde vacht zullen nauwkeurig bestudeerd worden. Vervolgens zal na het opofferen van de muizen de normale muizen hematopoëse (witte bloedcellen, neutrofielen, granulocyten, rode bloedcellen en plaatjes aantallen), de organen (necrose aan of afwezig), en het beenmerg (cel compositie) bestudeerd worden.

Type dierproef 3: bijlage 3

Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen.

We zullen de expressie van cel kenmerken *in vitro* beïnvloeden in leukemie cellen (cellijnen of patiënt leukemie cellen) en vervolgens deze al dan niet gelabelde leukemie cellen injecteren in de muizen. Ook zullen we al dan niet gelabelde leukemie cellen met een hoge en een lage expressie van een cel kenmerk met behulp van flow cytometrie vanuit een leukemie populatie worden opgezuiverd (het isoleren van cel fracties) en in een bepaalde hoeveelheid (van 10 tot 10⁷ cellen) in de muis worden ingespoten. Na injectie van de cellen (cellijnen of patiënt cellen) zal wel of niet therapie worden toegepast. Na maximaal 20 weken

zullen het beenmerg, het bloed, de milt en de lever bestudeerd worden op de aanwezigheid van humane leukemie en normale bloedcellen met behulp van flow cytometry. De humane leukemie en normale cellen kunnen onderscheiden worden van de muizencellen door middel van antilichamen gericht tegen humane leukemische en normale membraan markers die specifiek tot expressie komen op één van de beiden cel typen. Het percentage leukemie cellen in het beenmerg van de muizen is een maat voor de uitgroei van de AML cellen. Het aantal leukemie cellen dat leukemie vorming kan geven in een verdunnings assay is een maat voor het aantal leukemie-initiërende cellen (LSCs) binnen de populatie. Met behulp van een re-transplantatie kan bepaald worden of het aantal LSCs door een behandeling met een therapie verminderd zijn.

Moduleren van gen expressie in leukemie cellen: Het genereren van leukemie en/of normale humane bloed cellen met gemoduleerde gen expressie zal *in vitro* gebeuren met behulp van verschillende methoden waaronder RNAi, CRISPR-CAS9 en overexpressie. Vervolgens zullen de leukemie cellen waarin de expressie van de geïdentificeerde cel kenmerken gemoduleerd zijn subcutaan, intraveneus of in het beenmerg worden geïnjecteerd. Na injectie van de cellen zal wel of niet therapie worden toegepast.

Keuze therapie: De gekozen therapie strategie zal gebaseerd zijn op de identiteit van de genen (therapie doelwitten) die door ons ontdekt worden in het laboratorium als potentieel succesvolle therapie doelwitten waarbij de leukemie (stam) cellen worden gedood. Deze therapieën zullen dus vaak gericht zijn tegen een gen of afwijking en daarom “targeted therapy” genoemd. Doelgerichte therapie is een behandeling met medicijnen die de groei en deling van kankercellen blokkeren doordat ze de werking van moleculen die de kankercellen nodig hebben om te overleven remmen. Als door ons geïdentificeerde genen mogelijk betrokken zijn bij overleving van kankercellen kunnen we deze rechtstreeks als doelwit gebruiken. Over het algemeen kun je “targeted” therapie indelen in twee groepen: de monoclonale antilichamen en de “small molecules”. De “small molecules” werken over het algemeen vanuit de binnenkant van de cel en blokkeren daar signaal transductie routes die de overleving van de kankercel remmen. Antilichamen zijn vaak gericht tegen membraan eiwitten die ook de signaaltransductie routes kunnen blokkeren die de kankercellen nodig hebben om te overleven. Als de door ons geïdentificeerde genen potentieel betrokken zijn bij de functie van het immuunsysteem zullen we gebruik gaan maken van immuuntherapie. Op het moment is er veel belangstelling voor het gebruik van immuuntherapie in verschillende vormen (CART cells, Bite antilichamen en antilichamen gekoppeld aan toxines bijvoorbeeld) waarbij gebruik wordt gemaakt van een behandeling die er voor zorgt dat het eigen afweersysteem de kankercellen beter kan vernietigen.

We zullen in enkele gevallen de leukemie cel fracties (genetisch, epigenetisch of fenotypische gedefinieerd) een tag geven (dit kan een aminozuur tag, een fluorescerend label, een DNA tag of een reporter zijn) en deze fracties gecombineerd of als fractie injecteren in de muis. Vervolgens zullen we verschillende mono en combinatie therapieën toepassen.

De aanwezigheid van leukemie cellen zal constant gemonitord worden door middel van bloedafname of het detecteren, door middel van bioluminescentie imaging, van met luciferase of fluorescerende eiwitten gelabelde cellen. Na maximaal 20 weken zullen het bloed, het beenmerg, de milt en de lever bestudeerd worden op de aanwezigheid van humane leukemie en normale bloedcellen en kan er gekeken worden wat het effect van de modulatie van de genen en/of de therapie op de uitgroei potentie van de leukemie (stam) cellen en de normale cellen is.

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.

In de experimenten in dit project zullen we leukemie cellijnen maar ook leukemie cellen afkomstig van patiënten, die uitgroei geven in het immuun deficiënte muizenmodel, gebruiken. In het verleden hebben we veel monsters getest voor uitgroei potentie en we hebben op dit moment dan ook verschillende monsters in onze biobank om de experimenten in bijlage 3 te kunnen uitvoeren. Om de komende 5 jaar genoeg monsters te hebben om alle experimenten uit te voeren moeten we doorgaan met het testen zodat een constante aanvulling van monsters met uitgroei potentie gegarandeerd is (Bijlage1). Bijlage 1 zal dus gedurende de 5 jaar van het project lopen.

Het onderzoek zal gericht zijn op de identificatie van nieuwe effectieve therapeutische strategieën (in de meeste gevallen in combinatie met chemotherapie of differentiatie therapie) tegen leukemie (stam) cellen.

De door ons ontdekte therapie doelwitten of strategieën zullen altijd eerst *in vitro* getest worden voor hun potentie als therapie doelwit. Vervolgens zullen we testen of gen modulatie of de nieuwe therapie (mono of combinatie therapie) effectief is in het elimineren van leukemie in het immuun deficiënte muizen model (Bijlage 3). We verwachten dat de meeste drugs/geneesmiddelen die we gaan identificeren al eerder beschreven zijn voor andere aandoeningen en kanker typen en al eerder getest zijn in een immuun deficiënt muizenmodel. Deze nieuwe geneesmiddelen zullen dan niet getest hoeven worden voor toxiciteit in bijlage 2. Als een medicijn nooit eerder bestudeerd is in dit muizenmodel zullen we aan de hand van de gegevens van wel geteste vergelijkbare therapieën behorende tot dezelfde groep van geneesmiddelen (gerichte tegen moleculen in dezelfde signaal transductie routes) de toxiciteit bij verschillende concentraties testen (Bijlage 2). Vanuit bijlage 1 zullen monsters geselecteerd worden die in bijlage 3 gebruikt gaan worden. Helemaal nieuwe therapieën zullen in bijlage 2 getest worden op toxiciteit en dan in bijlage 3 gebruikt worden voor hun effect op overleving van leukemie (stam) cellen.

Het uiteindelijke doel is om optimale gerichte individuele curatieve therapie te ontwikkelen zodat alle leukemie cellen geëlimineerd worden en recidief wordt voorkomen. De uitkomsten van deze dierexperimenten zullen bij succes snel worden vertaald naar een klinische toepassing en zullen hopelijk bijdragen tot een significante verbetering van de overleving van leukemie patiënten.

Mijlpalen en keuzemomenten:

Voordat muizenproeven gedaan zullen worden:

Alle lopende projecten in ons laboratorium hebben als uiteindelijk doel om therapie te ontwikkelen die de terugkeer van leukemie tegen gaat en alle leukemiecellen in de patiënt kan doden. De AML terugkeer wordt veroorzaakt door in het lichaam achtergebleven LSCs die opnieuw kunnen uitgroeien tot een leukemie. Naast LSCs zitten er ook normale hematopoietische stamcellen, verantwoordelijk voor het herstel van de normale bloedcellen na therapie, in het beenmerg van de leukemie patiënt. Het succes van een therapie is daarom afhankelijk van de modulatie van genen die uiteindelijk tot de dood van LSCs leiden maar waarbij de normale cellen gespaard blijven. Aan de hand van de karakterisatie (genetische en epigenetische expressie profilering) van opgezuiverde leukemie (stam) cellen voor en na therapie van patiënten hebben we kenmerken geïdentificeerd die mogelijk therapeutische aangrijpingspunten zijn. We kunnen, gebruik makend van leukemie cellijnen en patiënten cellen, in een reageerbuis testen of medicijnen gericht tegen deze genen in staat zijn om de leukemie (stam) cellen te elimineren. Zodra we zien dat deze medicijnen effectief zijn *in vitro* (leukemie cellijnen worden gedood) en *ex vivo* (patiënten leukemie cellen worden gedood en normale cellen blijven leven) door het medicijn zullen we de effectiviteit van het medicijn in het muizenmodel testen. Voordat we muizenproeven starten zullen dus altijd in het laboratorium hebben plaatsgevonden:

- In vitro* identificatie van kenmerken (leukemie cel intrinsiek of aanwezig in de beenmerg omgeving) die mogelijk een rol spelen bij de ontwikkeling van een recidief.
- In vitro* en *ex vivo* identificatie van effectieve behandelingen die leukemie cellen kunnen elimineren en normale gezonde cellen sparen.

Muizenproeven

Bijlage 1: Het genereren van een biobank van myeloïde leukemie monsters die de capaciteit hebben om in de immuun deficiënte muis uit te groeien. Selectie van leukemie monsters geschikt voor muizen experimenten.

Bijlage 2: Bepalen van de maximaal getolereerde dosis waarbij een effect mogelijk is. Als het medicijn in een dosering moet worden toegepast waarbij veel toxiciteit verwacht wordt gaan we deze therapieën niet gebruiken in bijlage 3. Go/No go beslissing.

Bijlage 3: Testen van de doelwitten/therapieën voor hun effectiviteit om leukemie cellen te elimineren en gezonde cellen te sparen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.
2	De bepaling van de maximaal getolereerde dosis (MTD) van een nieuwe therapie in de

	<i>immuundeficiëntie muis</i>
3	<i>Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen.</i>
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC), Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	<i>Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.</i>

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De dierproef beschreven in deze bijlage 1 zal worden gebruikt om te bestuderen of leukemie patiënten samples leukemie cellen bevatten die aanslaan (gaan groeien) in het immuundeficiëntie muizenmodel en tevens of deze leukemie cellen na uitgroei dezelfde kenmerken behouden als dat ze in de patiënt hadden. Deze patiënten samples met de potentie tot uitgroei kunnen dan gebruikt worden voor experimenten beschreven in bijlage 3.

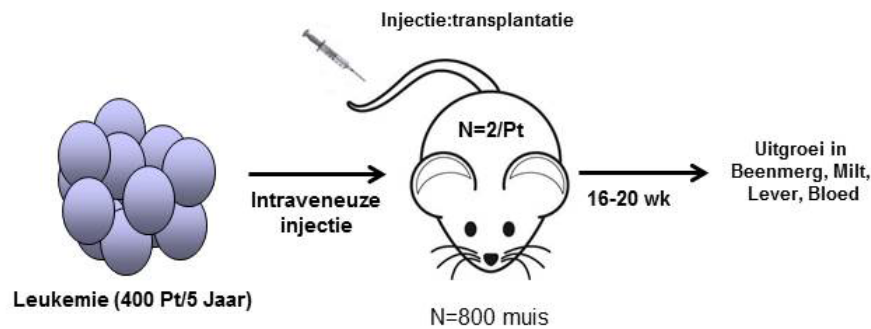
Het immuun-deficiëntie muizen model is de gouden standaard voor het bestuderen van de overleving en uitgroei van leukemie cellen en is ook het meest gebruikte model voor bestudering van overleving van humane leukemie cellen met stamcel eigenschappen. Voor het testen van nieuwe therapie aanknopingspunten en methoden om leukemie te elimineren (bijlage 3) hebben we humane leukemie monsters nodig die na injectie in een immuun deficiënt muizen model gaan uitgroeien. Wij hebben in het verleden gezien dat in dit muizen model ongeveer 15% van de leukemie patiënten monsters een uitgroei geeft boven de 15%. We gebruiken een hoeveelheid cellen representatief voor 12 complete monsters per jaar om alle experimenten uit te voeren binnen de huidig lopende projecten. We verwachten 80 leukemie monsters per jaar (15% van 80=12) te moeten testen op uitgroei capaciteit om voldoende materiaal te verkrijgen voor onze dierproeven.

Experimentele aanpak (Figuur 1 bijlage 1)

- a) De muizen worden bestraald om de muizenbeenmergcellen te elimineren en ruimte in het beenmerg te creëren voor de humane leukemie en normale hematopoietische cellen.
- b) Enige tijd later (1 tot 7 dagen) krijgen de muizen humane leukemie cellen ingespoten (patiënt cellen).
- c) De uitgroei van de tumoren wordt gevolgd door visuele inspectie (imaging) en/of bloedanalyse.
- d) Enige tijd later (1-20 weken) zullen de tumor hoeveelheid en karakteristieken van de humane cellen in het

beenmerg, de milt, het bloed en de lever van de muis bekeken worden.

Figure 1 Bijlage 1



Figuur 1: We zullen in bijlage 1 leukiemimonsters injecteren in immuun deficiënte muizen en de potentie om uit te groeien bestuderen. De monsters die uitgroeien zullen we gebruiken voor het bestuderen van het effect van gen modulatie en nieuwe therapieën op leukemie (stem) cel groei in bijlage 3.

Primaire uitkomstparameters

Leukemie groei in het beenmerg, het bloed, de milt en de lever van de muizen zal gebruikt worden als uitlees parameter voor de potentie van patiënten cellen om uit te groeien in de muis. Zestien tot twintig weken na injectie van de patiënt cellen worden alle cellen verwijderd uit het beenmerg, de milt en de lever van de muizen en geanalyseerd voor aanwezigheid van humane CD45 en CD33 (myeloïde humane leukemie) en muis CD45 positieve cellen. Dit geeft aan of de cellen afkomstig zijn van de patiënt of van de muis. De expressie van leukemie geassocieerde kenmerken (immunofenotypisch en/of moleculair) zal bekeken worden om te ontdekken of de cellen die uitgegroeid zijn in de immuun deficiënte muizen normaal of leukemisch zijn. Het percentage "uitgroei" (totale hoeveelheid humane cellen/totale hoeveelheid cellen x100) zal bepaald worden maar ook de absolute aantallen van leukemie en muis cellen in het beenmerg/milt/lever. Het meten van absolute aantallen leukemie cellen is essentieel omdat de hoeveelheid muizencellen die zich vormen in het beenmerg van de muis sterk afhangt van de hoeveelheid leukemie die gevormd wordt. Hoe meer leukemie hoe minder muizencellen. Dit is ook wat gezien wordt in leukemie patiënten waarbij leukemie de ontwikkeling van normale hematopoietische cellen remt.

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.

Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.

De leukemie cellen van patiënten (waarvan we meer dan 100 miljoen cellen in onze biobank hebben) worden gescreend voor leukemie initiërende/uitgroei capaciteit. Uit eerdere experimenten is gebleken dat het succes percentage ongeveer 66% (>0.1% uitgroei) en 37% (>10% uitgroei) bedraagt (37% van de AML patiënten geeft uitgroei in het NSG muizenmodel waarbij er meer dan 10% humane cellen in het beenmerg waar te nemen zijn)[1].

Voor experimenten beschreven in bijlage 3 hebben we leukemie samples nodig die meer dan 15% uitgroei geven in het immuun deficiënte muizen model. We hebben zelf in het verleden gezien dat dit de frequentie van uitgroei (meer dan 15%) minder is dan beschreven in de literatuur [1] en ongeveer 15% van de samples zijn. Dit onderdeel van het project is nodig om patiënten materiaal te identificeren dat uitgroei vertoont in het immuun deficiënte muizenmodel en dat vervolgens gebruikt kan worden in de experimenten (Flow chart in project voorstel; Figuur 1).

Het betreft experimenten waarbij 6-8 weken oude immuun deficiënte muizen eerst worden bestraald en waarin vervolgens humane primaire leukemie cellen intraveneus worden ingespoten. Op dag 0 krijgen de muizen een sub-letale dosis bestraling wat cytokine productie tot gevolg heeft. Hierdoor wordt uitgroei van (stem)cellen in het beenmerg bevorderd. Op dag 2-7 worden de leukemie cellen toegediend. De muizen krijgen twee weken voor injectie van de leukemiecellen antibiotica in hun drinkwater om infecties te voorkomen en houden dit drinkwater een week na injectie. Op dag 0 worden de cellen toegediend en op dag 140-168 worden de muizen geofferd en wordt de aanwezigheid van leukemie en normale cellen beoordeeld met behulp van flow cytometrie (aanwezigheid van humaan CD45+ en CD33+ cellen voor "uitgroei", CD11b voor differentiatie, CD3 voor T cellen en CD19 voor B cellen) van de cellen in het beenmerg, milt, de lever en het bloed. Mochten er voor dag

140-168 ziekte verschijnselen optreden (gewichtsverlies >15%, drie dagen achter elkaar gemeten of meer dan 20% gewichtsverlies gemeten op 1 dag, malaise (afwijkend gedrag, minder poetsgedrag, gebochelde houding, isolatie uit de groep) dan worden de muizen eerder geofferd en post-mortem de aanwezigheid van leukemie en normale cellen beoordeeld.

Handelingen:

- 1) Bestralen
- 2) Injecteren van leukemie patiënten cellen.
- 3) Offeren van de dieren.

Referentie 1: A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. Leukemia. 2009; 23(11):2109-17.

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

Hoeveelheid muizen nodig (n=800 in 5 jaar)

We injecteren 2 muizen intraveneus met leukemie cellen voor elk patiënten sample. We hebben in het verleden waargenomen dat als twee muizen ingespoten zijn er een vergelijkbaar uitgroei percentage (en absolute aantallen cellen) worden waargenomen in beide muizen aan het eind van het experiment. In het verleden en aan het aantal experimenten beschreven in onze verschillende projecten zien we dat het totale aantal uitvoerbare experimenten in 5 jaar ongeveer 12 nieuwe AML samples met uitgroei potentie per jaar vereist. Om dit te bewerkstelligen moeten we rond de 80 samples (80x15% is 12) per jaar testen voor potentie tot uitgroei. Dit betekent dat we 160 muizen per jaar (800 in 5 jaar) nodig hebben binnen deze bijlage 1.

B. De dieren

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

Diersoort: Immunodeficiënte muizen. We zullen het NOD/SCID/IL2 gamma chain (NSG) knock-out muizenmodel gebruiken of een immuun deficiënte muis geoptimaliseerd om ook de omgeving te humaniseren, bijvoorbeeld de NRG-SGM3 muis, de NOD.Cg-Kit^{W-41J} Tyr⁺ Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/ThomJ (NBSGW) muis, de NSG-Tg (hu-SCF), de MISTRG muis en het humane scaffold muizen model waarbij humane beenmerg scaffolds worden ingebracht.

We gebruiken zowel mannetjes als de vrouwtjes muizen tussen de 6-10 weken oud.

Herkomst: De dieren zullen uit eigen fok verkregen worden of gekocht worden bij een erkende proefdier leverancier.

Geschatte aantallen: We zullen voor dit onderdeel 160 dieren per jaar gaan gebruiken. 15% uitgroei frequentie dus 15% van 80=12 samples nodig per jaar. Elke sample wordt in 2 muizen ingespoten dus 160 muizen per jaar. Voor de screening van patiënten cellen hebben we 800 muizen nodig voor de komende 5 jaar (Figuur 2 in Bijlage 3).

Levensstadia: De muizen zullen gebruikt worden als ze 6-10 weken oud zijn.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

X 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?

X 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: We zullen in het laboratorium doelwitten ontdekken die mogelijk gebruikt kunnen worden als aangrijpingspunten voor therapie. Deze *in vitro* experimenten worden echter niet als bewijs gezien voor een

effect van de therapie op leukemie (stam)cellen in een organisme. Dit omdat het beenmerg van de leukemie patiënt met het daarbij behorende micromilieu in een *in vitro* situatie niet aanwezig is. De factoren geproduceerd door de stromale cellen van het beenmerg zijn van essentieel belang voor de uitgroei van (stam)cellen. Het is daardoor niet mogelijk om adequaat bewijs te vergaren met behulp van *in vitro* experimenten en er is daarom geen goed alternatief voor deze dierproeven. Het ontwikkelen van geneesmiddelen voor patiënten met leukemie wordt altijd gestart door onderzoek in een reageerbuisje maar zal dan vervolgens *in vivo* in de muis preklinisch getest moeten worden voordat het in de patiënt in een klinische studie gebruikt kan worden.

Vermindering: We hebben een aantal methoden/factoren geoptimaliseerd waardoor bij het doen van de experimenten het aantal proefdieren zo beperkt mogelijk blijft.

- Het gebruik van het immuun deficiënte muizen model laat de beste uitgroei van stamcel achtige cellen zien van de beschikbare muizenmodellen en zal daardoor het aantal benodigde dieren beperkt houden.
- We zullen zowel de mannetjes en de vrouwtjes gebruiken en hebben in het verleden waargenomen dat 2 muizen per patiënten sample genoeg is om een betrouwbaar resultaat te krijgen.
- Omdat er een verhoogd risico op infecties als gevolg van immuundeficiëntie hebben we barrière maatregelen genomen om infecties te voorkomen. De dieren zullen met steriele handschoenen worden gehanteerd en alle handeling vinden plaats onder laminaire flow condities waardoor uitval niet plaatsvindt.
- We zullen altijd de absolute aantallen leukemiecellen in het beenmerg van de muis bekijken (door het verwijderen van alle cellen uit het beenmerg). Dit voorkomt heterogeniteit van "uitgroei" veroorzaakt door de variatie in hoeveelheid muizencellen in het beenmerg en zal het aantal muizen dat nodig is om reproduceerbare resultaten te krijgen beperken tot 2 per patiënten sample

Verfijning: De noodzakelijke dierproeven zullen uitsluitend uitgevoerd worden in de muis. De kennis en expertise opgebouwd uit het kanker onderzoek in muizen met een defect immuunsysteem in ongekend groot en deze muis is dan ook uitermate geschikt om nieuwe behandelmethoden voor leukemie te bestuderen. We zullen de experimenten binnen dit project op een zodanige manier opzetten dat de dieren zo min mogelijk ongerief ondervinden tijdens het experiment. De dieren zullen goede huisvesting hebben en de uitvoering van de experimenten zal alleen gebeuren door bevoegd en bekwaam personeel. We hebben een aantal analisten met veel proefdierervaring in dienst. Dieren zullen in een eerder stadium dan het verkrijgen van matig ongerief of sterfte door de leukemie getermineerd worden, waarna de verdere analyses *in vitro* plaats vinden. Dit voorkomt onnodig lijden en ernstig ongerief voor de dieren. De dieren zullen in individueel geventileerde kooien worden gehuisvest wat de kans op infectie zal verkleinen. Ook krijgen de dieren tijdens (een deel van) het experiment antibiotica in hun drinkwater.

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.

Gedurende het hele experiment zullen maatregelen genomen worden om de kans op pijn, lijden en angst bij de dieren tot een minimum te beperken.

- Dit zal bewerkstelligd worden door optimale huisvesting van de dieren en uitvoering van de experimenten door zeer bekwaam personeel.
- De lengte van het experiment is zo gekozen dat de kans op ernstige ziekte als gevolg van de leukemie minimaal is, maar lang genoeg om leukemie te kunnen detecteren.

Bij het eindpunt van het experiment worden de dieren onder narcose gedood.

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.

De dierproeven uitgevoerd met patiënten samples zijn nog niet eerder uitgevoerd omdat de te gebruiken patiënten samples uniek aanwezig zijn in onze aangelegde biobank

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

verzorgd?

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het bestralen van de dieren kan er voor zorgen dat de dieren een lichte terugval in gewicht krijgen. Dit zal leiden tot licht ongerief. De toediening (intraveneus) van de leukemie cellen is eenmalig waardoor het ongerief beperkt blijft. Euthanasie onder narcose en het wegvan van de dieren zal licht ongerief geven. De dieren ingespoten met leukemie cellen kunnen anemie ontwikkelen wat enkele dagen kan duren. Dit kan matig ongerief geven voor maximaal twee dagen. In het verleden hebben we waargenomen dat dit bij ongeveer bij 5% van de dieren plaatsvindt. Omdat immuundeficiëntie dieren gebruikt worden is er een verhoogd risico op infecties wat het welzijn van de dieren kan aantasten. Ervaring uit het verleden leert dat uitval, en het gepaarde ongerief, als gevolg van een infectie niet voorkomt.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak van de dip (gewichtsverlies) na de bestraling wordt veroorzaakt door algehele malaise en het niet/minder eten van de dieren met als mogelijke oorzaak het ziek voelen. De anemie wordt veroorzaakt doordat de dieren leukemie in het beenmerg en de milt krijgen.

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

Na de bestraling geven we het voer in de bak zodat de dieren makkelijkere toegang hebben tot het voedsel. Ook geven we het voedsel in pap vorm om de eetlust en de drempel om te eten van/voor de dieren te verhogen.

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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De criteria voor humane eindpunten zijn als volgt:

Mochten er voor dag 140-168 ziekteverschijnselen optreden bijvoorbeeld gewichtsverlies > 15% t.o.v. dag 1 op drie opeenvolgende dagen of op 1 dag meer dan 20%, algehele malaise (afwijkend gedrag, afwijkende houding (kromming van de rug) minder poetsgedrag, afwijkende vacht (pilo-erectie), isolatie uit de groep) dan worden de muizen eerder getermineerd en post-mortem de mogelijke aanwezigheid van leukemie beoordeeld.

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

5%

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.

Exp. Handelingen	Kwalificatie ongerief*	Duur
Transport naar bestralingsfaciliteit	Licht	10 minuten (100% van de muizen)
Bestraling (subletale dosis)	Licht	Enkele minuten (eenmalig) Een week na de bestraling kan er een dip in gewicht optreden wat veroorzaakt wordt door een kortdurende afname van voedselintake/welbevinden (100% van de muizen).
Toediening van leukemie cellen	Licht	Enkele minuten, Eenmalig (100% van de muizen)
Leukemie vorming-anaemie	Matig	Maximaal 2 dagen voor 5% van de dieren.
Lichte narcose toedienen	Licht	Eenmalig, 1 minuut (100% van de dieren)
Wegen	Licht	Meerdere malen, minuten (100% van de dieren)
Doden van de dieren	Licht	Onder anesthesie, enkele minuten (eenmalig).

Het cumulatieve ongerief zal matig zijn voor 5% (n=40) van de dieren.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Aan het einde van het experiment worden de dieren gedood om post mortem de leukemie die in de dieren zit te analyseren

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

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

X Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC), Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	<i>De bepaling van de maximaal getolereerde dosis van een nieuwe therapie in de immuundeficiëntie muis</i>

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

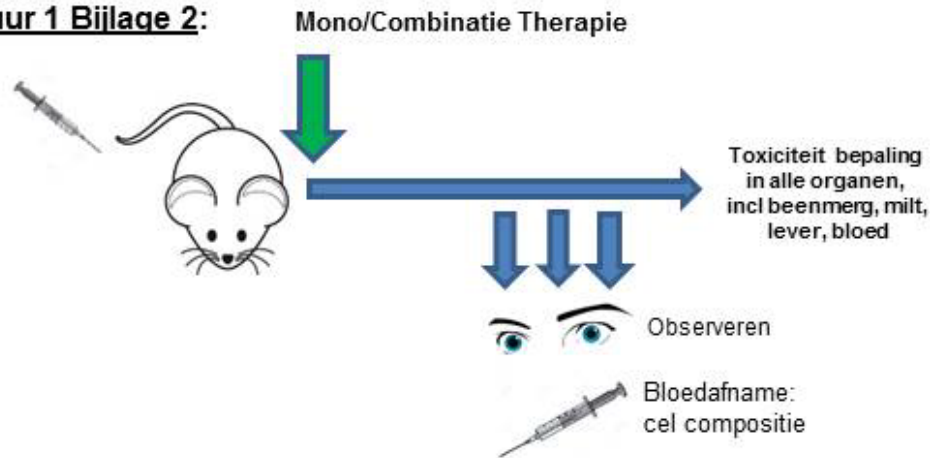
Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Voordat we nieuwe therapieën, nooit eerder getest voor inductie van toxiciteit in de immuun deficiënte muis, zullen testen in het muizen model voor het effect op eliminatie van leukemie (stam) cellen (in bijlage 3) zullen we eerst de maximaal (verwachte effectieve) tolereerbare dosis (MTD) bepalen. We zullen een experiment doen waarbij we verschillende concentraties van de therapie zullen injecteren en vervolgens de muizen goed observeren voor het verschijnen van ziekteverschijnselen. Na het opofferen van de muizen rond dag 140-168 zullen we ook de organen (inclusief lever, darmen, hart, normale bloedcellen, nieren) bestuderen op de aanwezigheid van afwijkingen.

Experimentele aanpak (Figuur 1 bijlage 2)

- 1) De muizen worden bestraald om de muizenbeenmergcellen te elimineren.
- 2) Enige tijd later (1-7 dagen) krijgen de muizen verschillende hoeveelheden van de nieuwe therapie (mono of combinatie therapie) geïnjecteerd.
- 3) De dieren zullen elke dag gecontroleerd worden op het optreden van ziekteverschijnselen; gewichtsverlies >15% t.o.v. dag 1 voor 3 opeenvolgende dagen of meer dan 25% op 1 dag, algehele malaise (afwijkend gedrag, afwijkende houding (kromming van de rug) minder poetsgedrag, afwijkende vacht (pilo-erectie), isolatie uit de groep.
- 4) Met behulp van bloedafnames op verschillende tijdstippen na injectie van de therapie zullen we de compositie (muizen bloedcellen) van het bloed bepalen (totale witte bloedcellen, rode bloedcellen, hemoglobine, plaatjes, neutrofielen, granulocyten, monoccyten, T cellen en B cellen).
- 5) Na 140-168 dagen zullen het bloed, het beenmerg en alle organen van de muizen worden uitgenomen en bekeken worden op cel compositie en afwijkingen.

Figuur 1 Bijlage 2:



Figuur 1: De muizen zullen bestraald worden en vervolgens zal een nieuwe therapie (in combinatie met bijvoorbeeld chemotherapie) nog nooit getest in het immuun deficiënte muizenmodel in verschillende doseringen worden geïnjecteerd. Toxiciteit zal bestudeerd worden.

Primaire uitkomstparameters

- 6) Als uitkomstparameter gebruiken we toxiciteit, afwijkingen in cel compositie van beenmerg, bloed en organen van de muis. We zullen de dieren observeren voor aanwezigheid van ziekte verschijnselen; gewichtsverlies >15% t.o.v. dag 1 voor 3 opeenvolgende dagen of meer dan 20% op 1 dag, malaise (afwijkend gedrag, minder poetsgedrag, gebochelde houding, isolatie uit de groep). Als deze ziekteverschijnselen zich voordoen worden de muizen geofferd en post-mortem de normale muizen hematopoëse (hoeveelheid witte bloedcellen, rode bloedcellen, hemoglobine, plaatjes, neutrofielen, granulocyten, rode bloedcellen en plaatjes, monocyt, T cellen en B cellen), de organen (necrose verschijnselen), en het beenmerg (compositie) bestudeerd. Ook zullen we door middel van bloedafnames op verschillende tijdstippen na injectie van de therapie de cel compositie (muizen bloedcellen) van het bloed bepalen. Op dag 140-168 zullen alle dieren worden geofferd en de normale muizen hematopoëse, de organen, en het beenmerg op afwijkingen bestudeerd worden.

Een voorbeeld van een MTD chemotherapie studie in het immuun deficiënte muizenmodel is beschreven in referentie 1.

- 1) AML cells are differentially sensitive to chemotherapy treatment in a human xenograft model (2013) Blood. 121(12):e90-7.

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.

We zullen immuun deficiënte muizen met verschillende hoeveelheden van de nieuwe therapie (meerdere malen) injecteren en de toxiciteit met behulp van bloedafnames en op het eindpunt (140-168 dagen) meten. We zullen concentraties en behandelingsprotocollen (injectie frequentie, hoeveelheden en injectie route) gebruiken die al eerder gebruikt zijn in immuun deficiënte muizen (gepubliceerde studies) en/of in studies met vergelijkbare medicijnen (medicijnen die tot dezelfde klasse of signaal transductie route behoren). We zullen concentraties gebruiken waarvan we verwachten dat ze remming zullen hebben op de leukemie vorming en die ook eventueel in de patiënt gebruikt worden of zullen worden.

6-8 weken oude immuun deficiënte muizen eerst worden bestraald en vervolgens zal na 1-7 dagen de therapie worden toegediend. Bloed afnames zullen verschillende malen worden gedaan en mochten er voor dag 140-168 ziekte verschijnselen optreden dan worden de muizen geofferd en wordt de aanwezigheid van normale muizen hematopoëse, de organen (necrose verschijnselen), en het beenmerg (compositie) bestudeerd.

De nieuwe therapie zal als monotherapie of in combinatie met bijvoorbeeld chemotherapie of differentiatie therapie worden toegediend. We zullen drie concentraties van de nieuwe therapie (wel en niet in een combinatie) toedienen. Dit zal binnen 1 experiment 8 groepen van muizen geven (Tabel 1 Bijlage 2).

Tabel 1

Groep muizen	Therapie
1) n=5 Controle	Geen therapie
2) n=5 Injectie mono conc1	Nieuwe therapie in laagste concentratie
3) n=5 Injectie mono conc2	Nieuwe therapie in middelste concentratie
4) n=5 Injectie mono conc3	Nieuwe therapie in hoogste concentratie
5) n=5 Injectie conc1+ Therapie2	Nieuwe therapie in laagste conc+ conc Therapie2
6) n=5 Injectie conc2+Therapie2	Nieuwe therapie in middelste conc+ conc Therapie2
7) n=5 Injectie conc3+Therapie2	Nieuwe therapie in hoogste conc+ conc Therapie2
8) n=5 Injectie Therapie2	Conc Therapie 2

Meestal zal de tweede therapie of chemotherapie of differentiatie therapie zijn.

Chemotherapie: We zullen een schema van toediening aanhouden waarbij cytarabine voor een aantal dagen wordt toegediend (intraperitoneaal of intraveneus) en waarbij dit in de eerste dagen gecombineerd wordt met een anthracycline, bijvoorbeeld doxorubicin of daunorubicin. Dit schema hebben we in het verleden gebruikt en is beschreven in een publicatie [1].

Differentiatie therapie: Voor het toedienen van differentiatie therapie zoals all trans retinoic acid (ATRA) zullen ATRA of controle pellets subcutaan geïmplementeerd worden onder een lichte narcose en pijnstilling. De muizen zullen op de plek van inbreng (nek) geschoren worden en een kleine insertie krijgen. Vervolgens zal de pellet ingebracht worden met een holle naald en de insertie met een hechting worden gedicht. Na de inbreng van de pellets krijgen de dieren pijnstilling in het drinkwater.

Handelingen:

1. Bestralen
2. Injecteren van de therapie (injectieroute en frequentie afhankelijk van therapie)
3. Bloedafnames (maximaal 1x per week, drie keer via staart vene of wang prik).
4. Offeren van de dieren (uittrekken van organen, bloed en beenmerg).

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

We verwachten dat de meeste therapieën die we identificeren al eerder in muizenstudies of klinische trials getest zijn (in andere tumor types of in andere combinaties). We verwachten dan ook niet meer dan 2 nieuwe therapieën in 5 jaar te ontdekken die nog nooit in een muizenmodel zijn getest. In bijlage 2 zullen we compleet nieuwe therapieën, nog nooit getest in een immuun deficiënt muizenmodel, testen voor toxiciteit door het toedienen van 3 verschillende concentraties (wel of niet in combinatie met een tweede therapie). We zullen drie groepen van muizen inspuiten met verschillende concentraties (met en zonder een additionele therapie). Uiteindelijk zullen dit 8 groepen geven, inclusief controles en de tweede therapie als monotherapie (Tabel 1 Bijlage 2). We verwachten bij toxiciteit door de nieuwe therapie een daling van het aantal cellen in de organen, het bloed of het beenmerg van minstens 18% om het afwijkend te noemen. De verwachte standaard deviatie is 10%. Bij een power van 80% ($\beta = 20$, $z_\beta = 0.84$) en een significantie van 0.05 (α) wordt het aantal muizen per groep: $2 \times (z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2) = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 25^2 = 3.9$. Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 4. Als er 4 dieren in een groep zitten kan het voorkomen dat er bij uitval van 1 van de muizen (door andere redenen dan toxiciteit van de therapie) geen significante resultaten zijn en we nemen daarom altijd 5 dieren per groep. We verwachten 2 experimenten in 5 jaar te doen met 40 dieren in een experiment (8x5) wat een totaal van 80 dieren is. Het totale aantal dieren in dit deel van het project is **80** (Figuur 2 bij Projectvoorstel).

B. De dieren

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

Diersoort: Immuun deficiënte muizen. We zullen het NOD/SCID/IL2 gamma chain (NSG) knock-out muizenmodel gebruiken of een immuun deficiënte muis geoptimaliseerd om ook de omgeving te humaniseren, bijvoorbeeld de NRG-SGM3 muis, de NOD.Cg-Kit^{W-41J} Tyr⁺ Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/ThomJ (NBSGW) muis, de NSG-Tg (hu-SCF), de MISTRG muis en het humane scaffold muizen model waarbij humane beenmerg scaffolds worden ingebracht.

We gebruiken zowel mannetjes als de vrouwtjes muizen tussen de 6-10 weken oud.

Herkomst: De dieren zullen uit eigen fok verkregen worden of gekocht worden bij een erkende proefdier leverancier.

Geschatte aantallen: We zullen voor dit onderdeel 80 dieren (2 experimenten van 40 muizen voor het testen

van de toxiciteit van twee therapieën) in 5 jaar gaan gebruiken (Figuur 2 in Bijlage 3).

Levensstadia: De muizen zullen gebruikt worden als ze 6-10 weken oud zijn.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: We zullen in het laboratorium doelwitten ontdekken die mogelijk gebruikt kunnen worden als aangrijpingspunten voor therapie. Deze therapieën kunnen helemaal nieuw zijn en toxiciteit geven in de muis. Voordat een nieuwe therapie in een grote groep muizen getest kan worden voor het elimineren van de leukemie moet eerst gekeken worden of de therapie schade, toxiciteit geeft aan organen in een compleet organisme. Deze toxiciteit studies zijn niet mogelijk door middel van *in vitro* studies omdat de organen en de samenstelling van bloed en beenmerg na behandeling met een medicijn alleen in een compleet organisme bekeken kan worden.

Vermindering: We hebben een aantal methoden/factoren geoptimaliseerd waardoor bij het doen van deze toxiciteit experimenten het aantal proefdieren zo beperkt mogelijk blijft

- Er is een verhoogd risico op uitval door infectie op infecties als gevolg van immuundeficiëntie. Dit wordt met barrière maatregelen voorkomen. De dieren worden gehuisvest in individueel geventileerde kooien en zullen met steriele handschoenen gehanteerd. Alle handeling vinden plaats onder laminaire flow condities.
- De proefopzet is zodanig dat bij uitval van 1 dier in een groep de resultaten van de proef nog steeds significant zijn en de proef niet herhaald hoeft te worden.
- Kleine hoeveelheden bloed (bloedmonsters) zullen tijdens de duur van het experiment van alle muizen genomen worden. Doordat we nu maar kleine hoeveelheden bloed nodig hebben om met flow cytometry de aantallen van de bloedcellen te bepalen kunnen we meerdere keren bloed afnemen bij een enkel dier..
- Veel medicijnen (of vergelijkbare medicijnen) zijn al getest voor MTD in het immuun deficiënte muizen model omdat dit muizenmodel wijdverbreid wordt gebruikt voor het ontdekken van therapie tegen allerlei tumoren. Dit zorgt er voor dat maar enkele nieuwe medicijnen (we verwachten maximaal 2 in 5 jaar) getest hoeven te worden voor de MTD in dit model.
- We zullen zowel de mannetjes en de vrouwtjes muizen gebruiken.

Verfijning: De noodzakelijke dierproeven zullen uitsluitend uitgevoerd worden in de muis. De kennis en expertise opgebouwd uit het kanker onderzoek in muizen met een defect immuunsysteem in ongekend groot en deze muis is dan ook uitermate geschikt om nieuwe behandelmethoden voor leukemie te bestuderen. We zullen de experimenten binnen dit project op een zodanige manier opzetten dat de dieren zo min mogelijk ongerief ondervinden tijdens het experiment. De dieren zullen goede huisvesting hebben en de uitvoering van de experimenten zal alleen gebeuren door bevoegd en bekwaam personeel. We hebben een aantal analisten met veel proefdierervaring in dienst. De dieren zullen in individueel geventileerde kooien worden gehuisvest wat de kans op infectie zal verkleinen.

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.

Gedurende het hele experiment zullen maatregelen genomen worden om de kans op pijn, lijden en angst bij de

dieren tot een minimum te beperken. Waar nodig worden de dieren onder anesthesie gebracht en kan pijnstilling worden toegepast.

- Dit zal bewerkstelligd worden door optimale huisvesting van de dieren en uitvoering van de experimenten door zeer bekwaam personeel.
- Bloedafname gebeurt door intraveneuze afname en zal maximaal 3x per week plaatsvinden hetgeen als een maximaal aantal beschouwd wordt waarbij geen pijn of lijden wordt veroorzaakt.

Bij de humane eindpunten van het experiment worden de dieren onder narcose gedood.

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.

De dierproeven uitgevoerd met deze nieuwe therapieën zijn nog niet eerder uitgevoerd. We hebben verschillende samenwerkingen lopen op het gebied van ontdekking van nieuwe therapie tegen de ontwikkeling leukemie. Deze samenwerkingen zijn op elkaar afgestemd zodat er geen onnodige duplicatie optreedt. Of dezelfde medicijnen getest worden door andere laboratoria zullen we nauwlettend in de gaten houden door het "up to date" blijven met gepubliceerde data maar ook door het bezoeken van congressen waar onderzoeksgroepen die vergelijkbaar werk doen aanwezig zullen zijn. De patiënten samples die wij in de experimenten testen zijn uniek.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voor het toedienen van ATRA of controle pellets zal een lichte narcose en pijnstilling worden toegediend. Na de inbreng van de pellets krijgen de dieren pijnstilling. Tijdens het herstel van de implantatie van de pellets liggen de dieren op een verwarmde mat. Bij het eindpunt van het experiment worden de dieren onder narcose gedood.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het bestralen van de dieren kan er voor zorgen dat de dieren een lichte terugval in gewicht krijgen. Dit zal leiden tot licht ongerief. Euthanasie onder narcose en het wegvan van de dieren zal licht ongerief geven. Omdat immuundeficiëntie dieren gebruikt worden is er een verhoogd risico op infecties wat het welzijn van de dieren kan aantasten. Omdat de dieren een verminderde afweer hebben worden ze gehuisvest in individueel geventileerde kooien waardoor de kans op een infectie laag is. Ervaring uit het verleden leert dat uitval, en het gepaarde ongerief, als gevolg van een infectie niet voorkomt. Als gevolg van de therapie kunnen de dieren bijwerkingen krijgen wat ingeschat wordt als ernstig ongerief voor maximaal een halve dag. Narcose voor inbreng van pellets wordt ingeschat als licht ongerief.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De bijwerkingen van de therapie kunnen veroorzaakt worden door schade aan 1 van de organen (bloed, beenmerg, lever, nieren, longen, hart etc) veroorzaakt door de therapie. De oorzaak van de dip (gewichtsverlies) na de bestraling wordt veroorzaakt door algehele malaise en het niet/minder eten van de dieren met als mogelijke oorzaak het ziek voelen.

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

Na de bestraling geven we het voer in de bak zodat de dieren makkelijkere toegang hebben tot het voedsel. Ook geven we het voedsel in pap vorm om de eetlust en de drempel om te eten van/voor de dieren te verhogen. De tijdsduur waarin schadelijke effecten als gevolg van een nieuwe therapie ondervonden worden zal beperkt blijven omdat we de dieren meerdere malen per dag zullen controleren op ziekteverschijnselen (zie humane eindpunten) zodat ernstig ongerief niet langer dan een halve dag zal duren. We zullen de dieren opofferen als ze een humaan eindpunt hebben bereikt als gevolg van de bijwerkingen.

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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De criteria voor humane eindpunten zijn als volgt:

Het kan voorkomen dat bij een bepaalde dosis van een nieuwe therapie pijn kan optreden als gevolg van toxiciteit. Zodra we waarnemen (elke dag observatie) dat er ziekteverschijnselen optreden bij de muizen en het humane eindpunt is bereikt zullen we de dieren meteen opofferen. Mochten er voor dag 140-168 ziekteverschijnselen optreden (gewichtsverlies > 15% t.o.v. dag 1 voor drie opeenvolgende dagen of meer dan 25% op 1 dag, algehele malaise (afwijkend gedrag, afwijkende houding (kromming van de rug) minder poetsgedrag, afwijkende vacht (pilo-erectie), isolatie uit de groep) dan worden de muizen eerder getermineerd en post-mortem de aantasting van bloed, beenmerg en alle organen bepaald. Omdat onbekend is welke doseringen van een nieuwe therapie bijwerkingen geven en hoe de pijn ingeschaald moet worden we bij ziekteverschijnselen door de therapie het ongerief ingeschat als ernstig.

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

We verwachten dat in 25% van de dieren binnen een experiment ziekteverschijnselen kunnen optreden als gevolg van toediening van een bepaalde dosering van de therapie. Deze dieren zullen het humane eindpunt bereiken voor het einde van het experiment en opgeofferd worden.

K. Classificatie van ongerief

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

Exp. Handelingen	Kwalificatie ongerief	Duur
Transport naar bestralingsfaciliteit	Licht	10 minuten (100% van de muizen)
Bestraling (subletale dosis)	Licht	Enkele minuten (eenmalig) Een week na de bestraling kan er een dip in gewicht optreden wat veroorzaakt wordt door een kortdurende afname van voedselintake/welbevinden (100% van de muizen).
Toedienen therapie	Licht	Enkele minuten, meermalig
Toxiciteit	Ernstig	Maximaal een halve dag (25% van de muizen)
Lichte narcose toedienen	Licht	Eenmalig, 1 minuut
Wegen	Licht	Meerdere malen, minuten
Doden van de dieren	Licht	Onder anesthesie, enkele minuten (eenmalig)

Het cumulatieve ongerief zal ernstig zijn voor naar schatting 25% (20 muizen) van de muizen.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Aan het einde van het experiment worden de dieren gedood om post mortem de toxiciteit/afwijkingen veroorzaakt door de therapie in de dieren te analyseren

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

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

X Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC), Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	3	<i>Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen in de muis.</i>

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

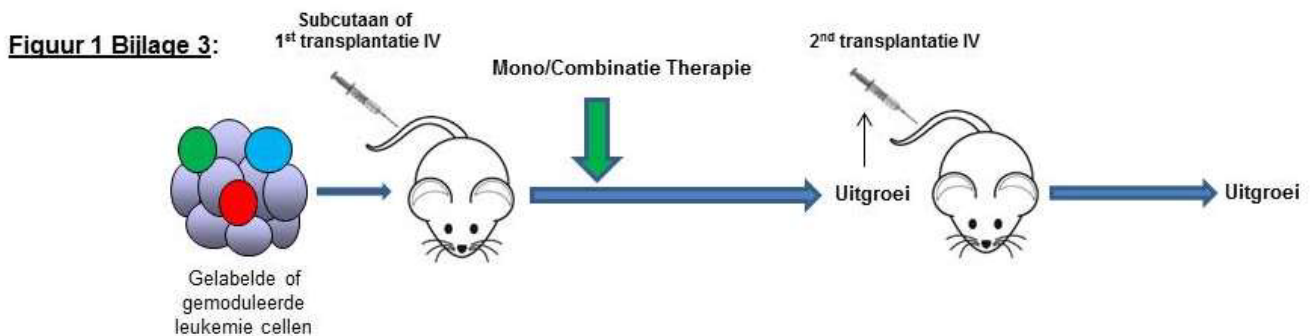
De keuze voor het immuun deficiënte muizen model voor het testen van nieuwe therapie aanknopingspunten en methoden om leukemie te elimineren is gebaseerd op het gegeven dat humane leukemie cellen van patiënten met acute myeloïde leukemie (AML) en chronische myeloïde leukemie (CML), maar ook cellen van het voorstadium van AML, het myelodysplastisch syndroom en normale hematopoietische stam cellen uitgroeien in dit muizen model. Het immuun deficiënte muizen model is de gouden standaard voor het bestuderen van de overleving van leukemie (stam) cellen. Dit muizen model is momenteel ook het geaccepteerde model om *in vivo* vast te stellen of er een effect van de modulatie van een gen of een nieuwe therapie is op overleving van leukemische en normale hematopoietische (stam) cellen door middel van het uitvoeren van een tweede transplantatie of een cel verdunning experiment.

Globale experimentele aanpak (Figuur 1 Bijlage 3)

- a) De muizen worden bestraald om de muizenbeenmergcellen te elimineren en ruimte in het beenmerg te creëren voor de humane leukemie en humane normale hematopoietische cellen.
- b) 1-7 dagen later krijgen de muizen humane leukemie (of normaal beenmerg) cellen (subcutaan, intraveneus of intrabeenmerg) ingespoten (cellijnen, cellen van patiënten of van gezonde donoren al dan niet gemoduleerd in gen expressie).
- c) De uitgroei van de leukemie of de normale cellen zal worden gevolgd door regelmatig de tumor omvang te meten (subcutane groei), visuele inspectie (imaging) en/of meerdere malen een bloedanalyse.
- d) Enkele dagen tot weken na de injectie van de leukemie (of normale) cellen krijgen de dieren wel of geen therapie volgens een vooraf bepaald schema. Deze therapie kan een monotherapie of een combinatie therapie zijn en kan bestaan uit chemotherapie, "targeted" therapie, "small molecules", differentiatie therapie, immuuntherapie met monoclonale antilichamen of immuuntherapie met cellulaire therapie. We zullen concentraties en toediening schema's hanteren zoals deze zijn beschreven in de literatuur voor de

desbetreffende therapie of die bepaald zijn door de experimenten in bijlage 2.

- e) Enige tijd later (1-168 dagen) zullen de tumor omvang (in het geval van subcutane injectie) en de hoeveelheid en karakteristieken van de humane cellen in het beenmerg, de milt, de lever en het bloed van de muis bekeken worden. De subcutane tumor zal om de dag met een schuifmaat worden gemeten. De hoeveelheid humane cellen in het bloed, beenmerg, milt en lever zullen bepaald worden met behulp van flow cytometrie. Cellen zullen worden verwijderd uit de verschillende organen en aangekleurd met antilichamen gericht tegen oa humaan CD45 (humane leukemie), CD34 (stamcellen/progenitoren), CD33/CD13 (myeloïde cellen), CD3 (T cellen), CD19 (B cellen), CD14 (monocyten).
- f) Na 140-168 dagen zullen de cellen vanuit de milt en het beenmerg van de eerste muizen (1^e transplantatie) voor elke conditie bij elkaar gedaan worden en zullen gelijke hoeveelheden van de humane cellen in 2^{de} muizen worden geïnjecteerd. Dit om te testen wat het effect van gen modulatie en therapie op LSC en normale HSC heeft. Enige tijd later (1-168 dagen) zullen weer de hoeveelheid en karakteristieken van de humane cellen in het beenmerg, de milt, de lever en het bloed van deze 2^e muizen bekeken worden. De hoeveelheid en karakteristieken van de humane cellen in het bloed, beenmerg, milt en lever zullen bepaald worden met behulp van flow cytometrie.



Figuur 1: De muizen zullen bestraald worden en vervolgens zullen de leukemie cellen van een patiënt intraveneus geïnjecteerd worden. Nieuwe therapie (in combinatie met bijvoorbeeld chemotherapie of differentiatie therapie) zal geïnjecteerd worden en vervolgens zal de uitgroei van de leukemie en de normale cellen bestudeerd worden in beenmerg, milt, bloed en lever. De humane leukemie zal vanuit de 1^{ste} getransplanteerde muizen in 2^{de} muizen geïnjecteerd worden (een re-transplantatie) en vervolgens zal weer de uitgroei van de leukemie en de normale cellen bestudeerd worden in beenmerg, milt, bloed en lever om het effect op uitgroei van leukemie en normale (stam) cellen te bepalen.

Primaire uitkomstparameters

Na gebruik van leukemie cellijnen

Leukemie cellijnen kunnen gebruikt worden om na subcutane injectie het effect van gen expressie modulatie of een therapie te bestuderen. De omvang van de tumor (leukemie subcutaan ingespoten vormt een subcutane tumor) zal op verschillende tijdstippen met een digitale schuifmaat worden gemeten en de omvang is een parameter voor tumor groei. Zodra het humane eindpunt bereikt is (2cm³) zal de muis uit het experiment worden gehaald.

Na gebruik van patiënt leukemie cellen

De remming (of verhoging) van leukemie of normale hematopoietische cel groei in het bloed, beenmerg, de milt en de lever van de muizen zal gebruikt worden als parameter voor het effect van de modulatie van gen expressie (genen en microRNAs) en/of het toedienen van een therapie. Alle cellen uit het beenmerg, de milt en de lever van de muis worden verwijderd en geanalyseerd voor aanwezigheid van cellen met humaan CD45 en CD33 en muis CD45 op het cel oppervlakte van de cellen. Dit zal aangeven hoeveel cellen afkomstig zijn van de patiënt en hoeveel van de muis. De expressie van leukemie geassocieerde kenmerken (immunofenotypisch en/of moleculair) zal bekeken worden om te ontdekken of de cellen die uitgegroeid zijn in de immuun deficiënte muizen normaal of leukemisch zijn. Het percentage "uitgroei" (totale hoeveelheid humane cellen/totale hoeveelheid cellen x100) zal bepaald worden maar ook de absolute aantallen van humane en muizen cellen in het beenmerg/milt/lever. Het meten van absolute aantallen leukemie cellen is essentieel omdat de hoeveelheid muizencellen die zich weer kunnen ontwikkelen in het beenmerg van de muis sterk afhangt van de hoeveelheid leukemie die gevormd wordt. Hoe meer leukemie hoe minder muizencellen. Dit is ook wat gezien wordt in leukemie patiënten waarbij de leukemie de ontwikkeling van normale hematopoietische cellen remt. Ook resulteert therapie vaak in toename van dode cellen die opgeruimd worden uit het muizenbeenmerg en verdwijnen.

Naast het bestuderen van de modulatie van uitgroei van de totale leukemie willen we de inhibitie of verhoging van overleving van LSCs en leukemie initiërende cellen bestuderen. Om LSCs of leukemie initiërende cellen aan te tonen zullen we een verdunningsexperiment en/of een re-transplantatie doen. In een verdunningsexperiment worden verschillende hoeveelheden van leukemiecellen ingespoten en vanuit de minimale hoeveelheid cellen waarbij uitgroei plaatsvindt wordt het aantal LSCs in de totale leukemie berekent. Met dit experiment kan gekeken worden wat het effect van modulatie van gen expressie of een therapie op de overleving van het aantal LSCs is. Ook een re-transplantatie kan laten zien of de modulatie van gen expressie of een therapie effect heeft op de overleving van LSCs en leukemie initiërende cellen. Bij een re-transplantatie worden de beenmergcellen vanuit getransplanteerde muizen (1^e transplantatie) waarbij de reconstitutie van humane cellen heeft plaatsgevonden ingespoten (2^e transplantatie) in een 2^{de} muis. De remming (of verhoging) van leukemie groei in het beenmerg, de milt en de lever van de muizen wordt gebruikt als parameter voor het effect van de modulatie van gen expressie (genen en microRNAs) en/of van de therapie op de overleving van LSCs. Alle cellen zullen na de 2^{de} transplantatie worden verwijderd uit het bloed, het beenmerg, de milt en de lever van de muis en geanalyseerd voor aanwezigheid van humane CD45 en CD33 en muis CD45 op het cel oppervlakte van de cellen. Dit geeft aan of de cellen afkomstig zijn van de patiënt of van de muis.

Detecteren van humane cellen in het bloed gedurende het experiment

Naast regelmatige bloedafnames en bepaling van de hoeveelheid humane cellen in het bloed zullen we de leukemie cellen ook markeren met luciferase of een fluorescerend label voordat ze geïnjecteerd worden in de muis. De uitgroei van de leukemie cellen kan dan gevolgd worden met bioluminescentie of fluorescentie met behulp van "imaging" van de muizen. De muizen worden bij het meten van luciferase activiteit (gekoppeld aan de humane cellen) onder narcose ingespoten met een luciferase substraat en gescand.

Naast het bepalen van de overleving van de humane cellen in de muis zullen de leukemie cellen die uitgegroeid zijn in sommige experimenten geanalyseerd worden voor aanwezigheid van genetische afwijkingen (door middel van exome sequencing), gen expressie (door middel van RNA sequencing) en immunofenotype (door middel van flow cytometry).

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

Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen.

Het betreft experimenten waarbij 6-8 weken oude immuun deficiënte muizen worden bestraald en waarin vervolgens een dag later leukemie cellijnen subcutaan of intraveneus en humane primaire leukemie cellen of normale hematopoietische cellen intraveneus of intrabeenmerg worden ingespoten.

1. De identificatie van kenmerken (genen) die een rol spelen bij leukemie initiatie, overleving van leukemie (stam) cellen en normale (stam) cellen, therapie gevoeligheid en differentiatie.

Dit deel van de dierproef heeft als doel om te bepalen of modulatie van gen expressie (van de door ons geïdentificeerde factoren) invloed heeft op leukemie initiatie, overleving van leukemie (stam) cellen en normale (stam) cellen, therapie gevoeligheid en cel differentiatie.

A: Gebruik van leukemie cellijnen

We zullen leukemie cellijnen subcutaan injecteren en het effect van gen expressie modulatie op de groei snelheid van de tumor meten door middel van het meten van de omvang van de tumor (leukemie subcutaan ingespoten vormt een subcutane tumor). De subcutane tumor zal op verschillende tijdstippen met een digitale schuifmaat worden gemeten en de omvang is een parameter voor tumor groei.

B. Gebruik patiënten cellen in een eerste transplantatie.

Na injectie van de leukemie cellen die wel of niet gemoduleerd zijn in gen expressie zal uiteindelijk het percentage humane cellen (of absolute aantallen cellen) wat aanwezig is in de muis aan het eind van het experiment bepaald worden. Hiermee kan bepaald worden of de modulatie van dat gen effect heeft gehad op leukemie groei/initiatie. De expressie van bepaalde membraan eiwitten (bijvoorbeeld CD11b, CD14 en CD15) op de cellen geeft aan of de cellen gedifferentieerd zijn. Het effect op de overleving van leukemie initiërende cellen en LSCs kan op twee manieren bepaald worden: verdunningsexperiment en een 2^{de} transplantatie. Leukemie cellen (soms opgezuiverd vanuit een heterogene populatie van AML cellen) wel of niet *in vitro* gemoduleerd in gen expressie zullen (in verschillende hoeveelheden of in 1 bepaalde hoeveelheid) worden geïnjecteerd (intraveneus of intra-beenmerg) in de muizen. Als een verdunningsexperiment plaats vindt kan vanuit de hoeveelheid cellen waarbij uitgroei plaatsvindt kan het aantal leukemie initiërende cellen (LSCs) berekent worden (L-Calcul Software, StemCell Technologies). Modulatie van gen expressie kan effect hebben op

de hoeveelheid cellen die nog in staat zijn om uitgroei van de leukemie te bewerkstelligen en met deze assay kan dus bepaald worden of de modulatie van gen expressie invloed heeft op de overleving van de leukemie en de LSCs.

C. Het effect van gen modulatie op overleving van LSCs door middel van een 2^e transplantatie.

Om LSCs aan te tonen zal een re-transplantatie experiment worden uitgevoerd waarbij de beenmergcellen vanuit een 1^{ste} getransplanteerde muis, waarbij reconstitutie van humane cellen heeft plaatsgevonden, verzameld worden en geïnjecteerd in een 2^{de} muis. In deze tweede muis zal een LSC leukemie geven en een gezonde stamcel uitgroei van gezonde bloedcellen. Als de controle muizen hun humaan eindpunt bereiken zullen zowel de controle als de met gen gemoduleerde leukemie cellen ingespoten muizen opgeofferd en getest worden voor aanwezigheid van leukemie.

2. Het preklinisch testen van de effectiviteit van therapie om leukemie (subpopulaties en stamcellen) te elimineren

Therapie testen

Dit deel van de dierproef heeft als doel om te bepalen of nieuwe therapie invloed heeft op leukemie initiatie, overleving van leukemie (stam) cellen en normale (stam) cellen, therapie gevoeligheid en differentiatie. Leukemie of normale cellen zullen geïnjecteerd worden in de muizen en vervolgens zullen de dieren een mono- of combinatie therapie toegediend krijgen. De gekozen therapeutische aanpak zal afhangen van het geïdentificeerde (en *in vitro* effectief bevonden) therapie doelwit gen. Afhankelijk van het middel wordt dit subcutaan, intraperitoneaal of intraveneus een aantal keren (maximaal vijf maal op aansluitende dagen) toegediend. Als het middel bekend is zal dit volgens doseringen en schema's die in de literatuur bekend zijn als effectieve en getolereerde doseringen worden toegediend. Als het nieuwe behandelingen zijn die nog nooit in een muis zijn getest voor toxiciteit en dosering bepaling zullen we een pilot experiment gaan uitvoeren met verschillende concentraties van het middel (bijlage 2). De therapie zal als monotherapie of in combinatie worden toegediend. In de meeste experimenten zal dit een combinatie met chemotherapie (bijvoorbeeld cytarabine en doxorubicin/daunorubicin) of differentiatie therapie (bijvoorbeeld all trans retinoic acid, ATRA) zijn. We verwachten maximaal 10 therapie strategieën te ontdekken en te testen in het muizen model in de 5 jaar dat het project zal lopen.

De combinatie met chemotherapie: We zullen in de meeste experimenten met chemotherapie een schema van toediening aanhouden waarbij cytarabine voor een aantal dagen wordt toegediend (intraperitoneaal of intraveneus) en waarbij dit in de eerste dagen gecombineerd wordt met een anthracycline, bijvoorbeeld doxorubicin of daunorubicin (intraperitoneaal of intraveneus). Dit schema hebben we in het verleden gebruikt en is beschreven in een publicatie [2]. Als er na 140-168 dagen leukemie (of normale uitgroei) wordt vastgesteld in het beenmerg of de milt van de muis zullen deze cellen ge-re-transplanteerd worden in een 2^e recipiënt muis. Na subcutane injectie van leukemie cellen zal ditzelfde schema van chemotherapie behandeling worden toegepast [2]. De behandeling van een subcutane tumor zal starten als de tumor zichtbaar begint te worden (50 mm³).

De combinatie met differentiatie therapie: Voor het toedienen van differentiatie therapie zoals bijvoorbeeld ATRA zullen (2-10 weken) na injectie van de leukemiecellen ATRA of controle pellets subcutaan geïmplementeerd worden onder lichte narcose en pijnstilling. De muizen zullen op de plek van inbreng (nek) geschoren worden en een kleine insertie krijgen. Vervolgens zal de pellet ingebracht worden met een holle naald en de insertie met een hechting worden gedicht. Na de inbreng van de pellets krijgen de dieren pijnstilling in het drinkwater.

Deze standaard therapie (chemotherapie of differentiatie therapie) zal al dan niet gecombineerd worden met therapeutische mogelijkheden die door ons ontdekt zijn in het lab. Dit kunnen therapieën zijn die gericht zijn tegen signaal transductie moleculen zoals "small molecules", recombinante eiwitten of oligonucleotides maar ook immuun therapie of differentiatie therapie. Het kan ook zijn dat we een membraan eiwit als therapeutisch doelwit identificeren en vervolgens immuuntherapie in de vorm van antilichamen of cellulaire therapie (bijvoorbeeld CART cellen) ontwikkelen en testen in het muizen model. De methoden, concentraties en frequentie van toediening van deze therapieën zal afhangen van de methoden beschreven in de literatuur. Voorbeelden van een anti-signalering (anti-demethylering) therapie in combinatie met ATRA en een antilichaam therapie zijn beschreven in twee publicaties [3, 4].

We zullen de leukemie cellen of de verschillende cel fracties (genetisch, epigenetisch of fenotypische gedefinieerd) soms een tag geven (dit kan een aminozuur tag, een fluorescerend label, een DNA tag of een reporter zijn) en deze fracties gecombineerd of als fractie injecteren in de muis.

We zullen het:

2A. Effect van de therapie op leukemie uitgroei in een 1^e transplantatie bepalen

Na injectie van de leukemie cellen en behandeling van de muizen zullen we vanuit het percentage humane cellen (of absolute aantallen cellen) aanwezig in de muis aan het eind van het experiment bepalen of de therapie effect heeft gehad op leukemie groei/initiatie. De expressie van bepaalde membraan eiwitten (bijvoorbeeld CD11b, CD14 en CD15) op de cellen geeft aan of de cellen gedifferentieerd zijn.

2B Het effect van de therapie op LSC overleving bepalen met een 2^e transplantatie

Om LSCs aan te tonen zal een re-transplantatie experiment worden uitgevoerd waarbij de beenmergcellen vanuit een 1^{ste} getransplanteerde muis, waarbij reconstitutie van humane cellen heeft plaatsgevonden, verzameld worden en geïnjecteerd in een 2^{de} muis. In deze tweede muis zal een LSC overleving leukemie geven en gezonde stamcel overleving uitgroei van gezonde bloedcellen. Als de controle muizen hun humaan eindpunt bereiken zullen zowel de controle als de met therapie behandelde muizen opgeofferd en getest worden voor aanwezigheid van leukemie.

Algemeen voor alle muizenproeven met patiënten cellen: De muizen krijgen twee weken voor injectie van de leukemiecellen antibiotica in hun drinkwater om infecties te voorkomen en houden dit drinkwater een week na injectie. Op dag 0 worden de cellen toegediend en wordt er vervolgens op verschillende tijdstippen gedurende het experiment veneus bloed afgenomen en het bloed beoordeeld met flow cytometry op de aanwezigheid van leukemie en normale humane cellen. Op dag 140-168 worden de muizen geofferd en wordt de aanwezigheid van leukemie en normale cellen beoordeeld door immuno-fenotypering van de cellen uit het beenmerg, de milt, het bloed en de lever (aanwezigheid van humaan CD45+ en CD33+ cellen voor "uitgroei", CD11b voor differentiatie, CD3 voor T cellen en CD19 voor B cellen). Mochten er voor dag 140-168 ziekte verschijnselen optreden (gewichtsverlies >15% voor drie dagen achter elkaar gemeten of meer dan 25% gemeten op 1 dag, malaise (afwijkend gedrag, minder poetsgedrag, gebochelde houding, isolatie uit de groep) dan worden de muizen eerder geofferd en post-mortem de aanwezigheid van leukemie en normale cellen beoordeeld.

[1] A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009; 23(11):2109-17.

[2] AML cells are differentially sensitive to chemotherapy treatment in a human xenograft model. *Blood*. 2013; 121(12):e90-7.

[3] Inhibition of the LSD1 (KDM1A) demethylase reactivates the all-trans-retinoic acid differentiation pathway in acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2012; 18(4):605-11.

[4] Targeting CD123 in acute myeloid leukemia using a T-cell-directed dual-affinity retargeting platform. *Blood*. 2016;127(1):122-31.

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

We verwachten maximaal 10 genen/therapie mogelijkheden in vijf jaar te ontdekken en te willen testen in een immuun deficiënt muizenmodel. De gen modulatie in leukemie cellen zal zowel in leukemie cellijnen als patiënten materiaal worden bekeken. Het effect van gen modulatie en therapie in patiënten cellen zal bekeken worden op de totale leukemie groei maar ook op de LSCs. Het effect op LSC overleving zal bekeken worden met een verdunningsexperiment maar ook met een 2^{de} transplantatie.

1. Testen van het effect van de modulatie in expressie van genen op leukemie uitgroei en LSCs overleving

A. Wij verwachten dat muizen die subcutaan ingespoten worden met leukemie cellen (cellijnen) met verhoogde of verlaagde gen expressie een remming/verhoging van de overleving van leukemie cel groei hebben van minstens 25%. In het verleden hebben we gezien dat de te verwachten standaard deviatie ongeveer 10% is. Bij een power van 80% ($\beta = 20$, $z_{\beta} = 0.84$) en een significantie van 0.05 (α) wordt het aantal muizen per groep: $2 \times (z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2) = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 25^2 = 2.5$. Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 3. Omdat de dieren op beide flanken worden ingespoten zou dit aantal minder kunnen zijn maar in het verleden hebben we gezien dat de tumoren soms verschillend groeien op de linker en de rechter flank. Bij subcutane groei zien we dat uitval van muizen niet plaatsvindt. Wij verwachten niet meer dan 1 experiment per jaar met een cellijn/subcutaan te gaan doen. Deze experimenten hebben twee groepen van muizen waarbij cellen (hoge en lage expressie van een gen) in verschillende hoeveelheden (4 concentraties) worden ingespoten in de muizen. Een experiment zal uit 8 groepen bestaan van n=3 dus een totaal van 24 muizen per experiment en een totaal van 5x24 is **120 muizen in 5 jaar**.

B. Uit de literatuur is bekend dat de muizen ingespoten met primaire leukemie cellen na 140-168 dagen leukemie hebben. Wij verwachten dat muizen die ingespoten zijn met verschillende concentraties van cellen met verhoogde of verlaagde gen expressie een remming of eliminatie van leukemie initiatie/groei hebben van minstens 20%. De verwachte standaard deviatie is ook hier weer 10%. Bij een power van 80% ($\beta = 20$, $z_\beta = 0.84$) en een significantie van 0.05 (α) wordt het aantal muizen per groep: $2 \times (z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2) = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 20^2 = 3.92$. Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 4. Als er 4 dieren in een groep zitten kan het voorkomen dat er bij uitval van 1 van de muizen geen significante resultaten zijn en we nemen daarom altijd 5 dieren per groep. Dit geldt voor elke groep in deze 1st transplantatie experimenten (verdunningsexperimenten). Uit de literatuur blijkt dat deze experimenten meestal met vijf cel concentraties worden uitgevoerd (met hoge en lage expressie van een gen) wat een totaal van 8 groepen muizen in 1 experiment geeft en een totaal van 50 muizen voor elk experiment. Wij verwachten (aan de hand van het aantal lopende en verwachte projecten) dat we 1 gen per jaar gaan testen en dat er rond de 4 (verdunning) experimenten (met 4 verschillende leukemie samples) moeten worden uitgevoerd om te bevestigen dat het gen betrokken is bij leukemie initiatie en groei. Dit zal dus een totaal van 20 experimenten met 50 muizen vereisen en een **totaal van 1000 muizen in 5 jaar** zijn.

Vanuit deze 1st transplantaties kunnen de cellen gere-transplanteerd worden in 2^{de} muizen om het effect van gen modulatie op LSC overleving te bepalen.

C. Het retransplanteren in een 2^e recipiënt muis zal grotere verschillen in humane uitgroei laten zien tussen de cellen met een hoge en een lage expressie dan de 1st transplantaties. Het is de verwachting dat uitgroei in 1^{ste} transplantatie zeker in de gevallen van injectie van de hoogste concentraties cellen positief is en daarom zullen we alleen deze twee concentraties gebruiken voor 2^{de} transplantaties. Wij verwachten hier minstens 25% verschillen in uitgroei met een SD van 10%. Bij een power van 80% ($\beta = 20$, $z_\beta = 0.84$) en een significantie van 0.05 (α) wordt het aantal muizen per groep: $2 \times (z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2) = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 25^2 = 2.54$. Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 3 in de re-transplantatie. Als er 3 dieren in een groep zitten kan het voorkomen dat er bij uitval van 1 van de muizen geen significante resultaten zijn en we nemen daarom altijd 4 dieren per groep. De humane cellen zullen vanuit de verdunningsexperimenten (zie 1^{ste} transplantatie) verzameld worden (2 groepen) en in muizen worden geïnjecteerd. Dit zullen dus 20 experimenten x 2 groepen is 40 muizen x n=4 een **totaal van 160 muizen zijn in 5 jaar**.

2. *Het preklinisch testen van de effectiviteit van therapie tegen leukemie (stam) cel uitgroei*

A. Wij verwachten dat muizen die leukemie hebben en vervolgens worden ingespoten met een mono of combinatie therapie een remming of eliminatie van leukemie initiatie/groei gaan geven van minstens 20%. De verwachte standaard deviatie is hier 10%. Bij een power van 80% ($\beta = 20$, $z_\beta = 0.84$) en een significantie van 0.05 (α) wordt het aantal muizen per groep: $2 \times (z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2) = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 20^2 = 3.92$. Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 4. Als er 4 dieren in een groep zitten kan het voorkomen dat er bij uitval van 1 van de muizen geen significante resultaten zijn en we nemen daarom altijd 5 dieren per groep. Wij verwachten (aan de hand van het aantal lopende en het aantal verwachte projecten) dat we 2 verschillende therapieën per jaar gaan testen voor effect op leukemie initiatie en groei. Elke therapie zal met vijf verschillende leukemie samples en twee normale gezonde samples getest moeten worden om te kunnen concluderen dat de therapie op verschillende subtypes van leukemie een specifiek effect heeft. Dit geeft een totaal van 70 experimenten (10 medicijnen in 5 jaar in 5 verschillende leukemie monsters en 2 normale monsters). De experimenten bevatten meestal 4 groepen (controle muizen, 2 monotherapieën en de combinatie) wat een totaal van 20 muizen per experiment is en een totaal van **1400 muizen is voor 5 jaar voor een 1^{ste} transplantatie**.

We verwachten dat we 2 therapieën in 5 jaar gaan testen voor het effect op het elimineren van getagde subpopulaties van cellen in 4 verschillende leukemie sample. Dit zal dus een totaal van 8 (2 medicijnen in 5 jaar in 4 verschillende leukemie monsters) experimenten zijn. De experimenten bevatten 2 groepen (controle muizen en de therapie) wat een totaal van 10 muizen per experiment is en een **totaal van 80 muizen is voor 5 jaar voor een 1^{ste} transplantatie**.

B. Het retransplanteren in een 2^e recipiënt muis zal grotere verschillen in humane uitgroei laten zien voor en na therapie dan de 1st transplantaties. Het is de verwachting dat uitgroei in 1^{ste} transplantatie. Wij verwachten hier minstens 25% verschillen met een SD van 10%. Bij een power van 80% ($\beta = 20$, $z_\beta = 0.84$) en een significantie van 0.05 (α) wordt het aantal muizen per groep: $2 \times (z_{\alpha/2} + z_\beta)^2 \times (s^2 / (\mu_1 - \mu_2)^2) = 2 \times 7.84 \times 10^2 / 25^2 = 2.54$. Het aantal te gebruiken dieren per groep is dus 3 in de re-transplantatie. Als er 3 dieren in een

groep zitten kan het voorkomen dat er bij uitval van 1 van de muizen geen significante resultaten zijn en we nemen daarom altijd 4 dieren per groep. Dit zullen dus 70 experimenten x 4 groepen x n=4 muizen en een totaal van **1120 muizen zijn voor 5 jaar** het eerste onderdeel en 8 experimenten x 2 groepen x n=4 muizen en een totaal van **64 muizen voor het tweede onderdeel** waarin we cellen met een tag voorzien.

B. De dieren

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

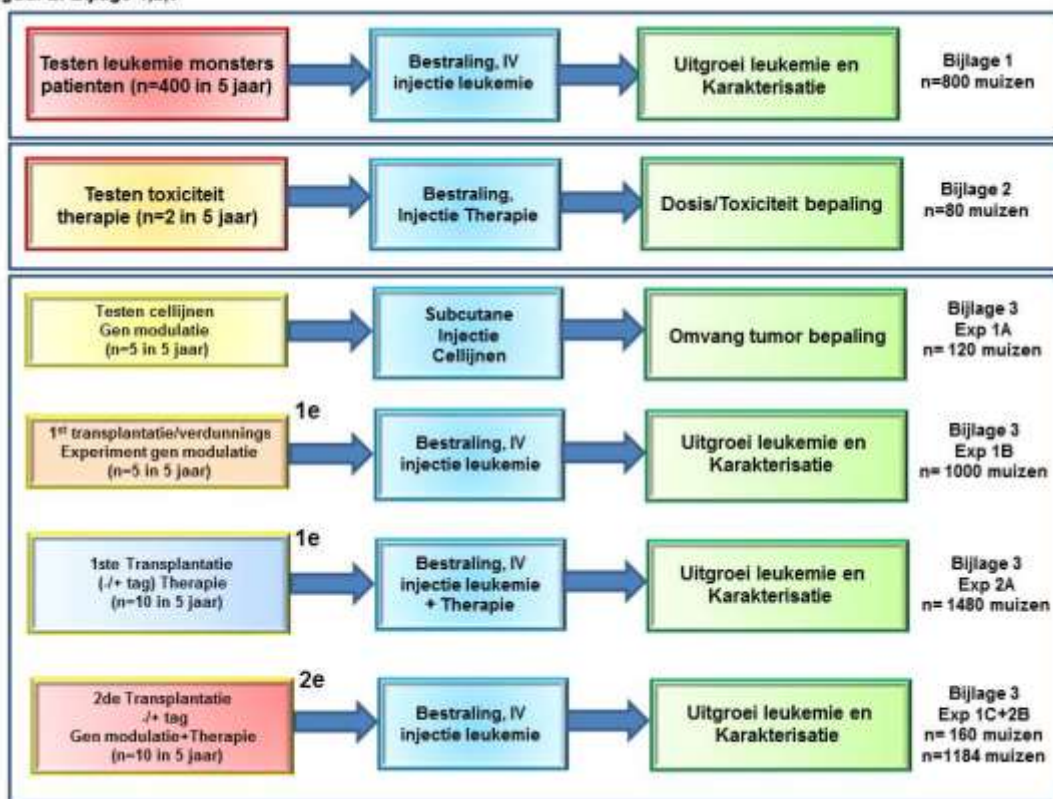
Diersoort: Immuun deficiënte muizen. We zullen het NOD/SCID/IL2 gamma chain (NSG) knock-out muizenmodel gebruiken of een immuun deficiënte muis geoptimaliseerd om ook de omgeving te humaniseren, bijvoorbeeld de NRG-SGM3 muis, de NOD.Cg-Kit^{W-41J} Tyr⁺ Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/ThomJ (NBSGW) muis, de NSG-Tg (hu-SCF), de MISTRG muis en het humane scaffold muizen model waarbij humane beenmerg scaffolds worden ingebracht. We gebruiken zowel mannetjes als de vrouwtjes muizen tussen de 6-10 weken oud.

Herkomst: De dieren zullen uit eigen fok verkregen worden of gekocht worden bij een erkende proefdier leverancier.

Geschatte aantallen: De totale aantallen muizen in dit deel van het project is 3944 muizen. De aantallen van de nodig voor de verschillende onderdelen staan beschreven in overwegingen en statische onderbouwing (onderdeel 1A-1C en 2A en 2B) en in Figuur 2 Bijlage 3).

Levensstadia: De muizen zullen gebruikt worden als ze 6-10 weken oud zijn.

Figuur 2: Bijlage 1,2,3



C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

X 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?

X Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

In vitro experimenten in een reageerbuis worden niet als bewijs gezien voor een effect van de gen modulatie of de therapie op leukemie (stam)cellen in een organisme. Dit omdat het beenmerg van de leukemie patiënt met het daarbij behorende micromilieu in een *in vitro* situatie niet aanwezig is. De factoren geproduceerd door de stromale cellen van het beenmerg zijn van essentieel belang voor de uitgroei van stamcellen. Het is daardoor niet mogelijk om adequaat bewijs te vergaren met behulp van *in vitro* experimenten en er is daarom geen goed alternatief voor deze dierproeven. Het ontwikkelen van geneesmiddelen voor patiënten met leukemie wordt altijd gestart door onderzoek in een reageerbuisje maar zal dan vervolgens *in vivo* in de muis preklinisch getest moeten worden voordat het in de patiënt in een klinische studie gebruikt kan worden.

Vermindering: We hebben een aantal methoden/factoren geoptimaliseerd waardoor bij het doen van de experimenten het aantal proefdieren zo beperkt mogelijk blijft.

- Het gebruik van het immuun deficiënte muizen model laat de beste uitgroei van stamcel achtige cellen zien van de beschikbare muizenmodellen en zal daardoor het aantal benodigde dieren beperkt houden.
- Er is een verhoogd risico op uitval als gevolg van infecties door de immuundeficiëntie. Dit zullen we met barrière maatregelen proberen te voorkomen. De dieren zullen met steriele handschoenen worden gehanteerd en alle handeling vinden plaats onder laminaire flow condities waardoor uitval als gevolg van een infectie niet plaatsvindt. De dieren worden ook gehuisvest in individueel geventileerde kooien.
- De proefopzet is zodanig dat bij uitval van 1 dier in een groep de resultaten van de proef nog steeds significant zijn en de proef niet herhaald hoeft te worden.
- We zullen altijd de absolute aantallen leukemiecellen in het beenmerg van de muis bekijken (door het verwijderen van alle cellen uit het beenmerg). Dit voorkomt heterogeniteit van uitgroei veroorzaakt door de variatie in hoeveelheid muizencellen in het beenmerg maar ook in hoeveelheid opgeruimde dode cellen. Het minimaliseren van heterogeniteit zorgt er voor dat er minimale aantallen muizen in een groep gebruikt kunnen worden voor het experiment.
- Kleine hoeveelheden bloed (bloedmonsters) zullen tijdens de duur van het experiment van alle muizen genomen worden. Doordat we nu meerdere keren bloed afnemen vergaren we al resultaten tijdens het experiment.
- Veel medicijnen (of medicijnen die tot dezelfde groep behoren) zijn al getest op toxiciteit in het immuun deficiënte muizen model omdat dit muizenmodel wijdverbreid wordt gebruikt voor het ontdekken van therapie tegen allerlei tumoren. Dit zorgt er voor dat maar enkele nieuwe medicijnen getest hoeven te worden op maximaal tolereerbare dosis (MTD) (bijlage 2).
- We zullen zowel de mannetjes en de vrouwtjes muizen gebruiken waardoor alle geboren muizen gebruikt kunnen worden en geen afvoer plaats vindt.
- De groei van leukemie zal tijdens de proef gevolgd worden door de cellen te labelen met luciferase of een fluorescerend label in combinatie met imaging technologie. Resultaten over de groei van de tumor kan dus nu tijdens de proef worden verkregen en het doden van het dier is niet meer de enige manier om de tumor in het lichaam te bestuderen.

Verfijning: De noodzakelijke dierproeven zullen uitsluitend uitgevoerd worden in de muis. De kennis en expertise opgebouwd uit het kanker onderzoek in muizen met een defect immuunsysteem in ongekend groot en deze muis is dan ook uitermate geschikt om nieuwe behandelmethoden voor leukemie te bestuderen. We zullen de experimenten binnen dit project op een zodanige manier opzetten dat de dieren zo min mogelijk ongerief ondervinden tijdens het experiment. De dieren zullen goede huisvesting hebben en de uitvoering van de experimenten zal alleen gebeuren door bevoegd en bekwaam personeel. We hebben een aantal analisten met veel proefdierervaring in dienst. Dieren zullen in een eerder stadium dan het verkrijgen van matig ongerief of sterfte door de leukemie getermineerd worden, waarna de verdere analyses *in vitro* plaats vinden. Dit voorkomt onnodig lijden en ernstig ongerief voor de dieren. De dieren zullen in individueel geventileerde kooien worden gehuisvest wat de kans op infectie zal verkleinen. Ook krijgen alle dieren tijdens (een deel van) het experiment antibiotica in hun drinkwater om ongewenste infecties door het zwakke immuunsysteem te voorkomen.

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.

Gedurende het hele experiment zullen maatregelen genomen worden om de kans op pijn, lijden en angst bij de dieren tot een minimum te beperken.

- Dit zal bewerkstelligd worden door optimale huisvesting van de dieren en uitvoering van de experimenten door bekwaam personeel.
- De lengte van het experiment is zo gekozen dat de kans op ernstige ziekte als gevolg van de leukemie minimaal is, maar lang genoeg om leukemie te kunnen detecteren.
- Voor het toedienen van differentiatie therapie (bijvoorbeeld ATRA) of controle pellets zal een lichte narcose en pijnstilling worden toegediend. Na de inbreng van de pellets krijgen de dieren ook pijnstilling.
- Het meten van tumoren met een schuifmaat zal met twee personen plaatsvinden zodat dit snel en efficiënt gebeurt. Het humane eindpunt is duidelijk gedefinieerd zodat de muizen niet onnodig zullen lijden door het hebben van hele grote subcutane tumoren.
- Bloedafname gebeurt door middel van intraveneuze afname en zal maximaal 3x per week plaatsvinden hetgeen als een maximaal aantal beschouwd wordt waarbij geen pijn of lijden wordt veroorzaakt.
- Bij experimenten die met imaging worden gevolgd worden de dieren onder narcose, liggend op een verwarmd plateau, gemeten.

Bij het eindpunt van het experiment worden de dieren onder narcose gedood.

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.

Door middel van gen expressie profilering hebben en zullen we genen en microRNAs identificeren die differentieel tot expressie komen tussen verschillende cel populaties in het leukemiebeenmerg. Deze door ons geïdentificeerde specifieke genen of mogelijke therapie doelwitten zullen we dan vervolgens karakteriseren voor hun rol in de overleving en therapie gevoeligheid van leukemie cellen. De door ons geïdentificeerde therapeutische mogelijkheden zullen we als monotherapie of combinatie therapie in de vorm van cytostatica, “targeted therapie”, remmers van signaal transductie paden, modulators van microRNA expressie en immunotherapie testen voor hun werkzaamheid. De dierproeven uitgevoerd met deze nieuwe therapieën zijn nog niet eerder uitgevoerd. We hebben verschillende samenwerkingen lopen op het gebied van ontdekking van nieuwe therapie tegen leukemie maar deze samenwerkingen zijn op elkaar afgestemd zodat er geen onnodige duplicatie optreedt. Of dezelfde therapieën getest worden door andere laboratoria zullen we nauwlettend in de gaten houden door het “up to date” blijven met gepubliceerde data maar ook door het bezoeken van congressen waar onderzoeksgroepen die vergelijkbaar werk doen aanwezig zullen zijn. De patiënten samples die wij in de experimenten testen zijn uniek.

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.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voor het toedienen van ATRA of controle pellets zal een lichte narcose en pijnstilling worden toegediend. Na de inbreng van de pellets krijgen de dieren pijnstilling in het drinkwater. Tijdens het herstel van de implantatie van de pellets liggen de dieren op een verwarmde mat. Bij experimenten die met imaging worden gevolgd worden de dieren onder narcose, liggend op een verwarmd plateau, gemeten. Bij het eindpunt van het experiment worden de dieren onder narcose gedood.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het bestralen van de dieren kan er voor zorgen dat de dieren een lichte terugval in gewicht krijgen. Dit zal leiden tot licht ongerief. De toediening (intraveneus) van de leukemie cellen is eenmalig waardoor het ongerief beperkt blijft. Euthanasie onder narcose en het wege van de dieren wordt als licht ongerief ingeschat. De dieren ingespoten met leukemie cellen kunnen anemie ontwikkelen wat enkele dagen kan duren. Dit kan matig ongerief geven voor maximaal twee dagen. In het verleden hebben we waargenomen dat dit bij ongeveer 5% van de dieren plaatsvindt. Omdat immuundeficiëntie dieren gebruikt worden is er een verhoogd risico op infecties wat het welzijn van de dieren kan aantasten. Ervaring uit het verleden leert dat uitval- als gevolg van een infectie niet voorkomt.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak van de dip (gewichtsverlies) na de bestraling en het inbrengen van de ATRA/PBS pellets of de behandeling met chemotherapie wordt vaak veroorzaakt door algehele malaise en het niet eten van de dieren met als mogelijke oorzaak het ziek voelen. De anemie wordt veroorzaakt doordat de dieren leukemie in het beenmerg en de milt krijgen.

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

Na de bestraling en het inbrengen van pellets of de behandeling met chemotherapie geven we het voer in de bak zodat de dieren makkelijkere toegang hebben tot het voedsel. Ook geven we het voedsel in pap vorm en geven we antibiotica en pijnstilling (zie boven) om de pijn te verminderen en de eetlust te verhogen.

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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De criteria voor humane eindpunten zijn als volgt:

Subcutane tumoren: Voor de groei van subcutane tumoren gebruiken we het verantwoorde eindpunt (volgens de Code of Practice Dierproeven in het Kankeronderzoek) van 10% van de het normale lichaamsgewicht. Dit is 2 cm³. De standaard weegfrequentie is 2-4x/week. Indien ziekteverschijnselen geconstateerd worden dan worden de dieren dagelijks gewogen.

Maximale systemische leukemiegroei: met behulp van imaging is geconstateerd dat het dier de maximale

tumorgroei (zit vol met leukemie) heeft bereikt.

Groei van leukemie in beenmerg/milt/lever en overschrijding ongerief: Mochten er voor dag 140-168 ziekteverschijnselen optreden (gewichtsverlies > 15% t.o.v. dag 1 voor drie opeenvolgende dagen of meer dan 20% in 1 dag, algehele malaise (afwijkend gedrag, afwijkende houding (kromming van de rug) minder poetsgedrag, afwijkende vacht (pilo-erectie), isolatie uit de groep) dan worden de muizen eerder getermineerd en post-mortem de mogelijke aanwezigheid van leukemie beoordeeld

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

In het geval van een subcutane tumorgroei is het 100% van de dieren die het humane eindpunt van 2 cm³ haalt. In het geval van systemische leukemie groei is het afhankelijk van het patiënten materiaal of het humane eindpunt van 140-168 dagen gehaald wordt. Inspuiten van sommige (5% van de muizen) leukemie monsters (in sommige muizen) kan leiden tot ziekteverschijnselen eerder dan deze 140-168 dagen.

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.

Exp. Handelingen	Kwalificatie ongerief	Duur	
Transport naar bestralingsfaciliteit	Licht	10 minuten (100% muizen)	
Bestraling (subletale dosis)	Licht	Enkele minuten (eenmalig) een week na de bestraling kan er een dip in gewicht optreden wat veroorzaakt wordt door een kortdurende afname van voedselintake/welbevinden (100% van de muizen).	
Toediening van leukemie cellen	Licht	Enkele minuten, Eenmalig (100% muizen)	
Toedienen therapie	Licht	Enkele minuten, meermalig (75% van 1400 muizen=1050 en 50% van 80=40 dieren in Exp2A)	
Toediening intraperitoneaal of intraveneus van chemotherapie	Licht	Meerdere malen, 1 minuut (niet bekend hoeveel dieren maar verwacht maximaal 30% van 1400 dieren=420 dieren in Exp2A).	
Perifere bloedafname via de staart vene	Licht	Meerdere malen maar 1 keer in de twee weken voor een maximaal aantal keren van 5. Duur is 5 minuten (100% van de dieren)	
Zodra perifere bloedafname via staart venen niet meer gaat; overgang naar wangprik	Matig	Meerdere malen maar 1 keer in de twee weken voor een maximaal aantal keren van 3. Duur is 5 minuten.	
Inbrengen van ATRA pellets	Licht	Eenmalig 10 minuten (niet bekend hoeveel dieren maar verwacht maximaal 30% van 1400 dieren=420 dieren in Exp2A).	
Toedienen luciferase en imaging	Licht	Eenmalig 5 minuten	
Metten van een subcutane tumor	Licht	1 minuut meerdere malen (3% van de dieren, 120 van de 3584 in Exp1A)	
Leukemie vorming-anaemie	Matig	Maximaal 2 dagen in 5% van de dieren.	
Lichte narcose toedienen	Licht	Eenmalig, 1 minuut (niet bekend hoeveel dieren maar verwacht maximaal 30% van 1400 dieren=420 dieren in Exp2A).	
Wegen	Licht	Meerdere malen, minuten (100% van de dieren)	
Doden van de dieren	Licht	Onder anesthesie, enkele minuten (eenmalig)	

De hoogste classificatie van ongerief zal matig zijn voor 5% van de muizen. Het totale cumulatieve ongerief zal matig zijn voor alle muizen.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

X Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.
Aan het einde van het experiment worden de dieren gedood om post mortem de leukemie die in de dieren zit te analyseren
Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?
☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.
X Ja

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
NVWA nummer 11400
2. Titel van het project:
De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam)cellen
3. Titel van de NTS:
De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam)cellen
4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC: *30-11-2016*
 - ☐ aanvraag compleet: *30-11-2016*
 - ☐ in vergadering besproken: *13-12-2016*
 - ☐ anderszins behandeld: *n.v.t.*
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - ☐ aanpassing aanvraag: *03-01-2017*
 - ☐ advies aan CCD: *27-01-2017*
7. Afstemming IvD
 - Datum advies IvD: *30-11-2016*
 - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1

- Datum: *15-12-2016*
- Strekking gestelde vragen: *Enkele tekstuele opmerkingen bij de NTS. De getallen kloppend maken in alle delen van de aanvraag. Check nog even de spelling. Waarom en wanneer kiest men een bepaalde therapie? Graag ziet de DEC hier meer uitleg over. Graag ook de in vitro en ex vivo experimenten noemen en toelichten. Graag nog toevoegen aan het ongeriefschema: doden van de dieren onder anesthesie, dit is licht ongerief.*
- Datum antwoord: *03-01-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): *n.v.t.*

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Is het project vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. 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. *n.v.t*

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 en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/ no go momenten beschreven. 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.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: *n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en translationeel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. *Het directe doel van deze studie is het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie(stam)cellen. Om dit doel te bereiken zal men genen testen op hun betrokkenheid bij leukemie initiatie, therapie gevoeligheid, proliferatie, "zelf-vernieuwing" en differentiatie in een immuundeficiënt muismodel. Vervolgens zal men therapieën, gericht tegen deze genen/signalerings routes, in mono- of combinatie therapie preklinisch testen op hun effectiviteit in het doden van leukemiecellen.*

Het uiteindelijke doel is om een effectief geneesmiddel en/of therapeutische strategie te ontwikkelen om leukemiecellen in leukemiepatiënten te elimineren en de terugkeer van de leukemie te voorkomen. Deze geneesmiddelen/therapeutische strategieën zullen gericht zijn tegen leukemiecellen die ongevoelig zijn voor de huidige gebruikte therapieën en zullen als mono- of combinatietherapie gericht zijn tegen het elimineren van alle leukemie cellen in de patiënt. Deze nieuwe geneesmiddelen/therapeutische strategieën zullen bijdragen aan betere overlevingskansen voor leukemiepatiënten.

Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel te bereiken.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden.

De belangrijkste belanghebbenden in dit project, dat gericht is op de ontwikkeling van therapeutische strategieën voor de behandeling van leukemie, zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.

De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het ontwikkelen van therapeutische strategieën voor de behandeling van leukemie.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: *n.v.t.*

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn.

Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er samengewerkt met de andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

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.

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. Deze inzichten kunnen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling voor leukemiepatiënten. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de logische opbouw van het onderzoek.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.

10. *De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.*
11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

De dieren ondervinden licht ongerief als gevolg van chemotherapie behandeling, bestraling, toediening injecties, operatie onder narcose, transport, wegen, imaging en doden van de dieren. Matig ongerief wordt bij 5% van de dieren verwacht als gevolg van leukemie. Bij de rest van de dieren zal het experiment beëindigd worden voordat de dieren matig ongerief ervaren van de leukemie. De bloedafname zal licht (type dierproef 1 en 2) tot maximaal matig (type dierproef 3) ongerief veroorzaken. Bij de dieren in type dierproef 2 zal een nieuwe therapie uitgetest worden om de toxiciteit te bepalen. De verwachting is dat dit gepaard zal gaan met maximaal matig ongerief, maar er is een kans bij 25% van deze dieren (n=20) op kortdurend ernstig ongerief vanwege bijwerkingen.

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren operaties ondergaan. Daarnaast zullen de dieren leukemie ontwikkelen, wat kan leiden tot maximaal matig ongerief. Bovendien kunnen de dieren ongerief ondervinden van de bloedafname en bijwerkingen.

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.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht of algehele malaise. Men verwacht in 5% de dieren de humane eindpunten toe te passen als gevolg van de zich ontwikkelende leukemie. Bij 25% van de dieren uit type dierproef 2 verwacht men de humane eindpunten toe te passen, als gevolg van toediening van een bepaalde dosering van de therapie. Voor de tumorgroei zal men de humane eindpunten volgens de Code of Practice voor kankeronderzoek toepassen.

3V's

14. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Het gebruik van dieren is nodig omdat er geen alternatieve methoden beschikbaar zijn waarmee men deze complexe processen, welke plaatsvinden in een organisme (de overleving van de gezonde cellen, herstel en ziekte), kan bestuderen. Pas wanneer in in vitro experimenten aangetoond is dat de toepassing van de therapie effectief blijkt zal een definitief bewijs gezocht worden in proefdierstudies. In het diermodel kunnen ook de bijwerkingen van de nieuwe therapie bekeken worden.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd.

De onderzoekers kiezen ervoor om muizen te gebruiken, omdat er muizen met een defect immuunsysteem beschikbaar zijn, waarin men humane leukemiecellen kan laten groeien. Men heeft bovendien veel ervaring met de muis als leukemiemodel, waardoor de nieuwe data goed te vergelijken is met eerdere resultaten.

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

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Het gebruik het meest geschikte muismodel, beide geslachten en ervaring met patiënten samples verminderd het aantal benodigde dieren.

Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 4824 muizen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

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

Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Verder zullen de dieren dagelijks beoordeeld worden en indien het dier het humaan eindpunt bereikt zal het uit de proef worden genomen. Alle experimenten zullen worden uitgevoerd door ervaren en bekwaam personeel.

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: *n.v.t.*

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? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

Zowel vrouwelijke als mannelijke dieren zullen worden gebruikt.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).

De dieren worden gedood om hun weefsel en (leukemie)cellen verder te kunnen analyseren.

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Dit is niet mogelijk omdat er een post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

Bij deze dierproef is de centrale morele vraag:

Rechtvaardigt de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van leukemie het gebruik van maximaal 4824 muizen in de dierproef die daarvan maximaal matig en in enkele gevallen ernstig ongerief ondervinden?

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.

De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden licht tot matig, en in enkele gevallen ernstig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: veel voordeel omdat de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van nieuwe geneesmiddelen/therapeutische strategieën voor de behandeling van leukemie.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 4824 muizen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen/therapeutische strategieën om leukemiecellen in leukemiepatiënten te elimineren en de terugkeer van de leukemie te voorkomen is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

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).

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen/therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie(stam)cellen. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een adequate behandeling van patiënten met leukemie is afgewogen tegen het, als maximaal matig en in enkele gevallen ernstig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 4824 muizen en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling van leukemie.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 4824 muizen en het daarbij verwachte maximaal matige en in enkele gevallen ernstige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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 is geen dilemma geconstateerd.

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 24 februari 2017 12:04
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven, datum klopt niet

Beste [REDACTED]

Wij zullen ervoor zorgen dat de vergunning wordt aangepast naar de aangevraagde startdatum,

Vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 24 februari 2017 11:09
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: FW: Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven, datum klopt niet
Urgentie: Hoog

Geachte CCD,

We hebben helaas nog geen antwoord van u ontvangen over de datum bij protocol 850.
Zie de mail hieronder. Graag horen we of dit aangepast kan worden.
Alvast bedankt!

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

From: [REDACTED]
Sent: dinsdag 21 februari 2017 12:57
To: 'info@zbo-ccd.nl'
Cc: [REDACTED]
Subject: FW: Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven, datum klopt niet

Geachte CCD,

De datum van de beslissing bij aanvraag AVD114002017850 van [REDACTED] klopt niet.
We hebben in het aanvraagformulier aangegeven dat men op 1-6-2017 wil beginnen met het onderzoek, het moet dus 1-6-2017 t/m 31-5-2022 zijn (5 jaar). Er staat nu maart in plaats van juni, graag zien we dat dit aangepast wordt.
Alvast bedankt!

Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Ps. Ik heb de beslissing doorgestuurd naar de onderzoeker, het mailadres moet [REDACTED] zijn i.p.v. [REDACTED]

[REDACTED]
Secretaris DEC en IvD VU-VUmc
Arbo & Milieu

[REDACTED]

From: [REDACTED]
Sent: maandag 20 februari 2017 16:00
To: [REDACTED]
Subject: Fwd: Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Ter info - [REDACTED]

Begin forwarded message:

From: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Subject: Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven
Date: 20 February 2017 at 15:45:37 GMT+1
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Vriendelijk verwijs ik u naar de brief en de bijlagen.

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

[REDACTED]
[REDACTED] AMSTERDAM
[REDACTED]

**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
AVD114002017850
Bijlagen
1

Datum 20 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam)" met aanvraagnummer AVD114002017850. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). 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 "De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam)" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de vergunning niet voor langer dan 5 jaar mag worden afgegeven.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

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

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit/ VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 27

januari 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:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD114002017850

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze: [REDACTED]

[REDACTED]
Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Datum:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD114002017850

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Vrije Universiteit Medisch Centrum

Adres:

Postcode en plaats: AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, voor het project "De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam)" met aanvraagnummer AVD114002017850, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit/ VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 27 januari 2017, ontvangen op 31 januari 2017.

Aanvraagnummer:
AVD114002017850

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Karakterisering van primaire AML en CML patiënten samples voor in-vivo leukemie initiërende capaciteit en uitgroei.				
	Muizen (Mus musculus) /	800	5% Matig 95% Licht	
3.4.4.2. De bepaling van de maximaal getolereerde dosis van een nieuwe therapie in de immuundeficiënte muis				
	Muizen (Mus musculus) /	80	25% Ernstig 75% Matig 75%	
3.4.4.3. Het testen van het effect van gen modulatie en/of therapie op de uitgroei van leukemie (stam) cellen in de muis.				
	Muizen (Mus musculus) /	3.944	100% Matig	

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

Aanvraagnummer:
AVD114002017850

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 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:

AVD114002017850

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:
AVD114002017850

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

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



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc)

Amsterdam

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

Info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD114002017850

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum 1 maart 2017

Betreft Correctie beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 31 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'De ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën tegen myeloïde leukemie (stam)' met aanvraagnummer AVD114002017850.

Beslissing

Op 20 februari 2017 heeft u de beschikking en vergunning van uw aanvraag ontvangen. Op 21 februari 2017 heeft uw contactpersoon contact met ons opgenomen, omdat de ingangsdatum van de vergunning niet correct is. In de vergunning staat dat de vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, terwijl u het aanvraagformulier heeft aangegeven dat de geplande ingangsdatum van het project 1 juni 2017 is.

De aan u verstuurde vergunning bevat dus een kennelijke verschrijving en kan gecorrigeerd worden. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2022.

Voor het overige blijft het besluit van 31 januari 2017 ongewijzigd.

Deze brief dient u bij uw vergunning te voegen.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

Datum

1 maart 2017

Onze referentieAanvraagnummer
AVD114002017850

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

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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