

|            |  |                                      |                        |             |               |                          |               |               |               |             |
|------------|--|--------------------------------------|------------------------|-------------|---------------|--------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
|            |  | <b>Inventaris Wob-verzoek W17-08</b> |                        |             |               |                          |               |               |               |             |
|            |  |                                      | <b>wordt verstrekt</b> |             |               | <b>weigeringsgronden</b> |               |               |               |             |
| <b>nr.</b> |  | <b>document NTS 2017855</b>          | <b>reeds openbaar</b>  | <b>niet</b> | <b>geheel</b> | <b>deels</b>             | <b>10.1.c</b> | <b>10.2.e</b> | <b>10.2.g</b> | <b>11.1</b> |
| 1          |  | Origineel aanvraagformulier          |                        |             |               | x                        |               | x             | x             |             |
| 2          |  | NTS                                  | x                      |             |               |                          |               |               |               |             |
| 3          |  | Projectvoorstel                      |                        |             |               | x                        | x             | x             | x             |             |
| 4          |  | Bijlage                              |                        |             |               | x                        | x             | x             | x             |             |
| 5          |  | DEC advies                           |                        |             |               | x                        |               | x             | x             |             |
| 6          |  | Mail verzoek verduidelijking DEC     |                        |             |               | x                        |               | x             | x             |             |
| 7          |  | DEC advies nieuw                     |                        |             |               | x                        |               | x             | x             |             |
| 8          |  | Advies CCD                           |                        | x           |               |                          |               |               |               | x           |
| 9          |  | Beschikking en vergunning            |                        |             |               | x                        |               | x             | x             |             |



## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven

#### Administratieve gegevens

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

## 1 Gegevens aanvrager

|     |                                                                                                                                                                           |                                                                    |                                                                                  |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 1.1 | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in | 10500                                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen           |                                                                                  |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.                                                                                 | Naam instelling of organisatie                                     | 10500                                                                            |
|     |                                                                                                                                                                           | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde                | Rijksuniversiteit Groningen                                                      |
|     |                                                                                                                                                                           | KvK-nummer                                                         | 1179037                                                                          |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer                                               | A. Deusinglaan 1, [REDACTED]                                                     |
|     |                                                                                                                                                                           | Postbus                                                            |                                                                                  |
|     |                                                                                                                                                                           | Postcode en plaats                                                 | 9713 AV GRONINGEN                                                                |
|     |                                                                                                                                                                           | IBAN                                                               | NL45ABNA0474567206                                                               |
|     |                                                                                                                                                                           | Tenaamstelling van het rekeningnummer                              | Rijksuniversiteit Groningen                                                      |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.                                                                                                                  | (Titel) Naam en voorletters                                        | [REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|     |                                                                                                                                                                           | Functie                                                            | [REDACTED]                                                                       |
|     |                                                                                                                                                                           | Afdeling                                                           | [REDACTED]                                                                       |
|     |                                                                                                                                                                           | Telefoonnummer                                                     | [REDACTED]                                                                       |
|     |                                                                                                                                                                           | E-mailadres                                                        | [REDACTED]                                                                       |
| 1.5 | (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.                                                                               | (Titel) Naam en voorletters                                        | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.                       |
|     |                                                                                                                                                                           | Functie                                                            |                                                                                  |
|     |                                                                                                                                                                           | Afdeling                                                           |                                                                                  |
|     |                                                                                                                                                                           | Telefoonnummer                                                     |                                                                                  |
|     |                                                                                                                                                                           | E-mailadres                                                        |                                                                                  |

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

## 2 Over uw aanvraag

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

### 3 Over uw project

- |             |                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |              |           |                                                                                          |             |                      |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------------------|
| 3.1         | Wat is de geplande start- en einddatum van het project?                                                                                      | <table border="1"> <tr> <td>Startdatum</td> <td>1 - 5 - 2017</td> </tr> <tr> <td>Einddatum</td> <td>1 - 5 - 2022</td> </tr> </table>                                                                                                                                    | Startdatum | 1 - 5 - 2017 | Einddatum | 1 - 5 - 2022                                                                             |             |                      |
| Startdatum  | 1 - 5 - 2017                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |              |           |                                                                                          |             |                      |
| Einddatum   | 1 - 5 - 2022                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |              |           |                                                                                          |             |                      |
| 3.2         | Wat is de titel van het project?                                                                                                             | Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten                                                                                                                                        |            |              |           |                                                                                          |             |                      |
| 3.3         | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?                                                                                         | Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethodes te kunnen verbeteren                                                                                                                                                                      |            |              |           |                                                                                          |             |                      |
| 3.4         | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt? | <table border="1"> <tr> <td>Naam DEC</td> <td>DEC-RUG</td> </tr> <tr> <td>Postadres</td> <td>A. Deusinglaan 1, <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>secrdec.umcg@umcg.nl</td> </tr> </table> | Naam DEC   | DEC-RUG      | Postadres | A. Deusinglaan 1, <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> | E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |
| Naam DEC    | DEC-RUG                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |              |           |                                                                                          |             |                      |
| Postadres   | A. Deusinglaan 1, <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |              |           |                                                                                          |             |                      |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                         |            |              |           |                                                                                          |             |                      |

## 4 Betaalgegevens

|     |                                                                                                                                                                   |                                                                                        |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| 4.1 | Om welk type aanvraag gaat het?                                                                                                                                   | <input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035      Lege |
|     |                                                                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> Wijziging €      Lege                                         |
| 4.2 | Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.                                                                                                              | <input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso                                     |
|     | <i>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.</i> | <input type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur                                   |

## 5 Checklist bijlagen

|     |                              |                                                                  |
|-----|------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 5.1 | Welke bijlagen stuurt u mee? | Verplicht                                                        |
|     |                              | <input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel              |
|     |                              | <input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting |
|     |                              | Overige bijlagen, indien van toepassing                          |
|     |                              | <input type="checkbox"/> Melding Machtiging                      |
|     |                              | <input type="checkbox"/>                                         |

## 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: | Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |      |  |         |  |        |           |       |     |              |  |
|              | Centrale Commissie<br>Dierproeven<br>Postbus 20401<br>2500 EK Den Haag                                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.</li> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.</li> <li>dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.</li> </ul> |      |  |         |  |        |           |       |     |              |  |
|              |                                                                                                                                          | <table> <tr> <td>Naam</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Plaats</td> <td>Groningen</td> </tr> <tr> <td>Datum</td> <td>- -</td> </tr> <tr> <td>Handtekening</td> <td></td> </tr> </table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Naam |  | Functie |  | Plaats | Groningen | Datum | - - | Handtekening |  |
| Naam         |                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |      |  |         |  |        |           |       |     |              |  |
| Functie      |                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |      |  |         |  |        |           |       |     |              |  |
| Plaats       | Groningen                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |      |  |         |  |        |           |       |     |              |  |
| Datum        | - -                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |      |  |         |  |        |           |       |     |              |  |
| Handtekening |                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |      |  |         |  |        |           |       |     |              |  |



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Leukemie is een vorm van bloedkanker die helaas nog moeilijk te genezen is (CRUK 2014, Burnett et al 2011). De ziekte wordt veroorzaakt door mutaties in ons DNA, hetgeen leidt tot een tekort aan uitgerijpte bloedcellen en een ophoping van immature voorlopercellen in het beenmerg. Verschillende combinaties van DNA mutaties kunnen leiden tot leukemie, en leukemie is dan ook een verzamelnaam van een groot aantal verschillende soorten van bloedkanker. Leukemie wordt behandeld met chemotherapie, soms in combinatie met beenmergtransplantaties, en hoewel de behandeling in eerste instantie vaak goed lijkt aan te slaan komt de ziekte vaak na verloop van tijd terug. Dit komt doordat er in veel gevallen een aantal therapie-resistente cellen zijn achtergebleven na behandeling, ook wel leukemische stamcellen genaamd, met als gevolg dat de ziekte terugkeert. Om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen is het dus van groot belang om fundamenteel onderzoek te doen naar de moleculaire mechanismen aan de ontwikkeling van leukemie, naar leukemische stamcellen, en naar mechanismen die zorgen voor drug resistentie in leukemische stamcellen. Daarnaast is het van belang om in vivo muizenmodellen te hebben voor verschillende soorten van leukemie om zo nieuwe vormen van therapie te kunnen evalueren.

Ons lab onderzoekt verschillende eigenschappen van leukemische stamcellen met inbegrip van de mechanismen die ten grondslag liggen aan hun zelfvernieuwing en mechanismen die betrokken zijn bij resistentie tegen de behandeling. Om dit te kunnen doen hebben we *in vitro* modellen gegenereerd van leukemie. Deze modellen werden ontwikkeld met behulp van retro/lentivirale transductie van humane CD34 + cellen uit navelstrengbloed of beenmerg met verschillende oncogenen en **tumor** suppressor genen. Voorbeelden hiervan zijn MLL/AF9, MLL/ENL, geactiveerd STAT5, BCR/ABL, TAK1, K-RAS, NPM, Flt3-ITD, TP53, SPI1, AML1, NUP98-HOXA9, AML-ETO, CITED2 en Polycomb repressie complex (PRC) leden, zoals BMI1. Voor deze in vitro experimenten maken we veelal gebruik van stromale cocultures, waarbij leukemische cellen in coculture gebracht worden met stromale cellen. Zowel normale als ook leukemische stamcellen bevinden zich in ons beenmerg, waar ze omgeven zijn door een groot scala aan andere celtypen, zoals mesenchymale stromale cellen, chondrocyten en adipocyten, tezamen ook wel de beenmerg niche genoemd. Interacties tussen stamcellen en deze niche zijn van groot belang om processen zoals zelfvernieuwing te reguleren, maar ook de gevoeligheid voor therapeutica wordt in sterke mate bepaald door de aanwezigheid van zo'n niche. Om deze niche zo goed mogelijk te kunnen nabootsen maken we gebruik van deze stromale cocultures.

Naast deze in vitro modellen hebben we in vivo modellen kunnen genereren met behulp van onze retro/lentivirale modellen als ook van primaire patiënten samples uit onze uitgebreide biobank. Voor deze in vivo experimenten maken we gebruik van onze humane niche xenograft muizenmodellen, waarin we een humane niche creëren in de muis. Humane mesenchymale stromal cellen worden gehecht op 3D scaffold materiaal samen met matrigel welke vervolgens subcutaan geïmplant wordt onder de huid op de rug van de muis. Deze mesenchymale stromale cellen zullen vervolgens bot gaan vormen, en differentiëren in verschillende stromale componenten om zo een humane niche te vormen, waarna leukemiecellen geïnjecteerd kunnen worden. We hebben kunnen laten zien dat dit in vivo model momenteel het beste model is dat momenteel beschikbaar is om leukemieontwikkeling te kunnen bestuderen ( ).

Studies die wij in de afgelopen jaren hebben gedaan maakten het mogelijk om kleine populaties van cellen te identificeren uit primair AML patiënten materiaal alsook vanuit retro/lentivirale leukemie modellen welke functionele eigenschappen van leukemische stamcellen hebben. Verder hebben wij de mechanismen bestudeerd waarmee een verscheidenheid van oncogenen transformatie van humane primaire CD34 + cellen uit navelstrengbloed induceren. Voor onze studie maken we gebruik van cellen die van de patiënt zelf afkomstig zijn en daarnaast van onze leukemische retro/lentivirale modellen. Hematopoietische tumoren ontstaan in het beenmerg, vanuit de zogenaamde stamcel niche, en nieuwe behandelmethoden zullen dan ook getest moeten worden in diermodellen waarin deze niche zo natuurgetrouw mogelijk is nagebootst. Dit is ook de locatie waar de tumorcellen door de chemotherapie en immunotherapie bereikt moeten kunnen worden, én het is ook de locatie waar de resistentie voor de therapie zich ontwikkelt en waar uiteindelijk de relapse van de ziekte zijn oorsprong kent.

Om die reden hebben we een gehumaniseerd muizenmodel ontwikkeld, door primair tumormateriaal in een humane "beenmergachtige" omgeving in muizen te laten uitgroeien ( ). Als daarin vervolgens tumorcellen van de patiënten worden geïnjecteerd, kunnen ze uitgroeien tot verschillende typen beenmergtumoren zoals we intussen hebben kunnen vaststellen.

Refs:

CRUK, Key Stats on the incidence, survival, mortality of specific cancers as well as the main causes and a table of the latest statistics., (2014)

Burnett, A., Wetzler, M., and Lowenberg, B., Therapeutic advances in acute myeloid leukemia, (2-10-2011) J.Clin.Oncol. 29, 487-494

### 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?

Binnen dit onderzoek willen we modellen van verschillende typen leukemie genereren en gebruiken met als doel:

- 1: om meer inzicht te krijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van leukemie en de ontwikkeling van resistentie tegen bestaande therapieën,
- 2: om betere behandelmethoden tegen leukemie te kunnen ontwikkelen.

We maken gebruik van onze retro/lentivirale transductiemodellen om zo een groot scala van specifieke oncogenen tot expressie te kunnen brengen in primaire humane cellen. Daarnaast maken we gebruik van primair leukemisch materiaal dat we direct van patiënten verkrijgen dat in onze biobank opgeslagen is. Zowel de cellen verkregen vanuit transductiemodellen alsook primaire patiënten cellen kunnen *in vitro* en *in vivo* bestudeerd worden. In deze studies willen wij bepalen of de kandidaat LSC (leukemische stam cel) populaties die we *in vitro* geïdentificeerd hebben de mogelijkheid hebben om leukemie *in vivo* te induceren. Verder willen wij ook de rol van specifieke "target genen" die wij in onze *in vitro* experimenten hebben geïdentificeerd met betrekking tot normale hematopoïese en leukemische transformatie valideren.

Op basis van deze gegevens willen wij proberen om een doelgerichte behandeling voor verschillende typen leukemie te ontwikkelen.

In de afgelopen jaren hebben we al veel tijd geïnvesteerd in het ontwikkelen van humane niche xenograft muizenmodellen, waarin we een humane niche creëren in de muis ( ). Deze *in vivo* xenograft modellen zijn momenteel de beste modellen die in het veld beschikbaar zijn om leukemieontwikkeling te kunnen bestuderen en nieuwe behandelmethoden te kunnen uittesten, hetgeen de haalbaarheid van deze projecten sterk ten goede komt.

### 3.3 Belang

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

Hoewel we in de afgelopen jaren een veel beter inzicht hebben gekregen in het ontstaan van leukemie, blijft de ziekte lastig te behandelen. Gemiddeld genomen is de 5-jaars survival van patiënten met leukemie nog steeds minder dan 30%. Dit komt doordat er een aantal cellen ongevoelig zijn voor cytostatica. Deze cellen worden ook wel leukemische stamcellen genoemd. Deze cellen kunnen na deling nieuwe stamcellen genereren ('zelfvernieuwing') en daarnaast kunnen ze leukemische dochtercellen genereren die snel delen maar verstoord zijn in hun uitrijping, waardoor er een ophoping plaatsvindt van niet goed uitgerijpte cellen in het beenmerg en de normale bloedfuncties niet goed vervuld kunnen worden. Terwijl de snel delende leukemische dochtercellen zeer gevoelig zijn voor chemotherapie zijn de langzaam delende leukemische stamcellen juist relatief ongevoelig. Aangezien deze cellen via hun zelfvernieuwingseigenschappen in staat zijn steeds weer een nieuwe tumor te vormen komt de ziekte naar verloop van tijd terug. Om werkelijk betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen zullen we dus meer inzicht moeten krijgen in de biologie van de leukemische stamcellen.

Een tweede aspect dat de behandeling van leukemie patiënten bemoeilijkt is dat er in individuele patiënten genetisch verschillende subkloons tegelijkertijd kunnen bestaan. Omdat deze kloons genetisch van elkaar verschillen, gekenmerkt door verschillende mutaties in het DNA, zullen deze subkloons misschien ook elk een specifieke behandeling of drug vereisen. Met behulp van deep sequencing hebben we deze klonale heterogeniteit in de afgelopen jaren in detail in kaart kunnen brengen. Daarnaast zijn we momenteel in staat om met behulp van flow cytometrie gecombineerd met onze kennis van specifieke plasma membraan marker expressie profielen op leukemische stamcel populaties om subkloons te identificeren en uiteindelijk ook te targeten.

Het wetenschappelijke en uiteindelijk ook klinische/maatschappelijke belang van onze studies is om meer inzicht te krijgen in welke behandelmethoden effectief zijn in het targetten van leukemische stamcelpopulaties, om zo een betere therapie te kunnen ontwikkelen voor patiënten met deze groep van bloedkankers.

Het uiteindelijke doel van onze studies is om tot betere behandelmethoden te komen voor leukemie patiënten. Omdat leukemie een heterogene groep van ziekten is, is het waarschijnlijk dat er niet 1 enkele specifieke therapie ontwikkeld zal kunnen worden, maar dat per leukemisch subtype bepaald zal moeten worden welke behandelmethode het meest effectief is. Vandaar dat we binnen onze studie een aantal verschillende muizenmodellen zullen gebruiken die model staan voor deze verschillende subtypen leukemie.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Leukemie blijft vooralsnog een moeilijk te behandelen ziekte waaraan nog altijd meer dan 50% van de patiënten binnen een periode van 2 tot 5 jaar na het ontdekken van de ziekte zal overlijden. De behandeling van patiënten hangt af van velerlei factoren; zo spelen de genetische afwijkingen een belangrijke rol, maar ook het stadium van ziekte waarin de patiënt zich bevindt, leeftijd en conditie van de patiënt enzovoorts. In het algemeen geldt, dat patiënten behandeld worden met chemotherapie, soms gecombineerd of gevolgd door een stamceltransplantatie (hetzij autoloog, hetzij allogeen) en daarna meestal opnieuw chemotherapie.

Momenteel komt de ziekte na behandeling nog vaak terug. Dat komt omdat er therapie-resistente leukemisch stamcellen achter zijn gebleven in de patiënt. Een belangrijk doel is dus om beter werkende alternatieve therapieën te ontwikkelen. Er zal een beter inzicht moeten komen in wat exact de kenmerken zijn van de resistentie (sub-)populaties tumorcellen die in de therapie resistente patiënten aanwezig zijn. Daarnaast is er een dringende behoefte aan meer selectief (patiënt-specifiek) werkende cytostatica terwijl ook nieuwe vormen van immunotherapie ontwikkeld en getest worden moeten op hun effectiviteit, zowel als monotherapie als in combinatie therapie. Door de complexiteit van het ziektebeeld en de beoogde behandeling is het essentieel om hiervoor geschikte diersmodellen te kunnen inzetten, welke representatief zijn voor de verschillende soorten leukemische subtypen.



Om onderzoeksresultaten zo goed mogelijk te kunnen vertalen naar een behandeling voor patiënten is het van belang om modellen te gebruiken die zo natuurgetrouw mogelijk de ziekte in de patiënt nabootsen. Om deze reden hebben we in de afgelopen jaren hebben al veel tijd geïnvesteerd in het ontwikkelen van humane niche xenograft muizenmodellen, waarin we een humane niche creëren in de muis ( ). Deze in vivo xenograft modellen zijn momenteel de beste modellen die in het veld beschikbaar zijn om leukemieontwikkeling te kunnen bestuderen en nieuwe behandelmethoden te kunnen uittesten.

Hoewel we hebben kunnen laten zien dat voor veel leukemische subtypen een humane omgeving essentieel is voor leukemie ontwikkeling in vivo, is het voor sommige andere subtypen minder van belang, en om deze subtypen te bestuderen zal een standaard IV injectie in muizen zonder humane scaffold afdoende zijn.

Naast ons gehumaniseerde muismodel zijn er de laatste jaren ook een aantal verschillende xenograft muizenmodellen gegenereerd waarin humane groeifactoren tot expressie gebracht worden. Dit betreft bijvoorbeeld NSG-SGM3 waarin humaan SCF, IL3 en GM-CSF tot expressie komen (Wunderlich et al, Leukemia 2010), en MISTRG muizen waarin humaan M-CSF, IL3/GM-CSF, TPO, and SIRPa tot expressie komen (Rongvaux et al, Nature Biotechnology 2014). In een vergelijkende studie willen we graag deze muizen vergelijken met onze humane scaffold muizen, en uiteindelijk zouden we ook graag onze scaffolds willen testen in deze humane cytokine muizen omdat te bestuderen in hoeverre dat nog een verdere verbetering van het humane scaffold model geeft.

Onze onderzoeksstrategie zal er globaal als volgt uitzien:

- a) Primair patiënten materiaal en cellen gegenereerd vanuit onze lentivirale transductiemodellen zullen in vitro gekweekt worden.
- b) In deze in vitro kweken zal de rol van leukemie subtype-specifieke targets bestudeerd worden en de gevoeligheid voor specifieke drugs zal beoordeeld worden. Dit is een belangrijk GO/NO GO beslismoment. Wanneer er in vitro geen effecten gemeten worden zullen er geen in vivo experimenten gestart worden.
- c) In vivo modellen zullen worden gegenereerd vanuit patiënten materiaal en lentivirale transductiemodellen gebruik makend van gehumaniseerde modellen, en na leukemie ontwikkeling zullen levende cel suspensies opgeslagen worden in onze biobank om zo verdere in vitro en in vivo experimenten (na secundaire transplantatie) te kunnen doen.
- d) Leukemie subtype-specifieke targets bestudeerd worden en specifieke drugs geïdentificeerd in in vitro kweken zullen in vivo getest 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.

---

Het gehumaniseerde muismodel zal de basis vormen voor de meeste experimenten die in dit project worden voorgesteld. Het biedt de mogelijkheid om de genetische en fenotypische kenmerken van de tumorcellen, het bijbehorende groeigedrag en de evolutie van de tumorcelpopulatie(s), onder invloed van chemo-immunotherapie bij de verschillende hematologisch maligniteiten te onderzoeken, maar daarnaast ook de mogelijkheden om nieuwe vormen van chemotherapie en immunotherapie te ontwikkelen of de effectiviteit van nieuwe chemotherapeutica bij therapie resistentie te testen en onderzoeken naar het doorbreken hiervan uit te kunnen voeren. Omdat steeds duidelijker wordt dat de stromale omgeving in de hematopoietische niche in belangrijke mate bijdraagt aan het ontsnappen aan de therapie alsmede het ontstaan van therapie resistentie, is het ook van groot belang dat de stromale component in het onderzoek betrokken kan worden. Het "hu-scaffold" model biedt uitgelezen mogelijkheden om al het voorgenomen onderzoek m.b.t. de pathofysiologie van en de therapie-ontwikkeling voor de hematologische tumoren uit voeren.

Binnen dit onderzoek willen we modellen van verschillende typen leukemie genereren en gebruiken met een tweeledig doel:

1: meer inzicht verkrijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van leukemie. Binnen dit deel willen we onderzoeken hoe (epi)genetische afwijkingen acute myeloïde leukemie (AML), chronische myeloïde leukemie (CML), acute lymfoïde leukemie (ALL) of het myelodysplastische syndroom (MDS) kunnen veroorzaken. We zijn hier met name geïnteresseerd in mechanismen die leiden tot maligne transformatie en mechanismen die leiden tot resistentie tegen chemotherapie.

---

2: om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen. Deze experimenten die erop zijn gericht om nieuwe chemo-therapeutica, nieuwe inhibitors, nieuwe monoklonale antilichamen en nieuwe cellulaire immuuntherapiën in het preklinisch ontwikkeltraject te testen op hun effectiviteit op primaire tumorcellen, om ze daarna zo snel mogelijk naar klinische toepassing te brengen. We zullen hier ook specifiek bestuderen of deze nieuwe methoden beter zijn in het targetten van leukemische stamcellen. Onder andere met behulp van onze inzichten in plasma membraan eiwitten die specifiek op leukemische stamcel populaties tot expressie komen kunnen we in onze diermodellen kijken of maligne cellen na klassieke behandeling met chemotherapie zijn achtergebleven (minimal residual disease, ofwel MRD) of deze populaties wel verdwenen zijn met alternatieve nieuwe methoden

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

Deel A. Meer inzicht verkrijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van leukemie. Binnen dit deel zullen de volgende experimenten gedaan worden:

1. het identificeren van subpopulatie cellen binnen individuele patiënten die in staat zijn leukemie te induceren in onze gehumaniseerde muizenmodellen. Op basis van eerder geïdentificeerde plasma membraan markers kunnen subpopulaties gesorteerd worden om vervolgens te injecteren in humane scaffolds. Op deze manier zal meer inzicht verkregen worden in de meest primitieve leukemische stamcel fracties. Daarnaast zullen deze studies ons in staat stellen om inzicht te verkrijgen in genetisch verschillende subclones die vaak naast elkaar kunnen bestaan in individuele patiënten.
2. Muisen met leukemie zullen behandeld worden met klassieke chemotherapeutica (bijvoorbeeld daunorubicine/doxorubicine) waarna de sneldelende dochtercellen zullen verdwijnen maar de ongevoelige resistente leukemische stamcellen zullen achterblijven. Deze zullen vervolgens in detail bestudeerd kunnen worden om zo meer inzicht te krijgen in moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan tumor resistentie.
3. De rol van de microenvironment zal in detail bestudeerd worden. Veranderingen in stromale cellen die veroorzaakt worden door aanwezigheid van tumor cellen zal in detail bestudeerd kunnen worden in ons humane scaffold model. Specifiek zal gekeken worden naar veranderingen in gen-expressie, -receptorexpressie, -cytokine secretie, inductie van tumorvorming, veranderingen in specifieke interacties tussen (normale) stromale cellen/endotheel cellen en de hematologische tumorcellen of tussen maligne stromale cellen met normale hematopoietische stamcellen (HSC). Naast gezonde MSCs kunnen genetisch gemodificeerde MSCs of MSCs van patiënten in ons scaffold model meegenomen worden. Uiteindelijk doel is om meer inzicht te verkrijgen in de interacties tussen tumorcellen en het stroma, hoe het stroma zelf hierdoor beïnvloed wordt, en hoe de normale hematopoiese hierdoor wordt verstoord. Op deze wijze hopen we tevens om nieuwe targets te vinden waarmee leukemie ontwikkeling tegengegaan zou kunnen worden.

Deel B: de ontwikkeling van betere behandelmethoden. Met behulp van het humane scaffold muizenmodel zullen de volgende behandelmethoden getest worden.

1. Het uittesten van nieuwe specifieke kinase remmers of epigenetische remmers die zich nog in het preklinische traject bevinden maar die in in vitro experimenten efficiënt leken in het targetten van leukemische stamcellen.
2. Het uittesten van antilichaam-gebaseerde immunotherapie, waarbij specifieke remmers in immunoliposomen verpakt worden met aan de buitenkant specifieke antilichamen gericht tegen markers die tot expressie komen op leukemische cellen om zo de immunoliposomen naar de juiste targetcellen te sturen.
3. Het uittesten van cellulaire immuuntherapie waarbij CAR-T cellen of andere immuuncompetente cellen gebruikt zullen worden, met of zonder immuunmodulatie.

Voordat in vivo experimenten gestart worden zullen eerst in vitro experimenten uitgevoerd worden zoals beschreven in sectie 3.4.1 'Onderzoeksstrategieën'. Deze in vitro experimenten zijn belangrijke mijlpalen voor vervolgonderzoek en GO/NO GO beslissingen zullen genomen worden op basis van in vitro experimenten. Wanneer in vitro geen effectiviteit gevonden wordt zullen geen in vivo experimenten gestart worden.

Voor alle bovenstaande therapieën geldt dat ze met of zonder standaard chemotherapie getest zullen worden. Binnen de studies onder deel B zal specifieke aandacht worden besteed aan de analyse van de verschillende genetische leukemische subkloons die naast elkaar kunnen bestaan in individuele patiënten. Met behulp van deep-sequencing en plasma membraan marker expressie mbv flow cytometrie zal gekeken worden of alle subkloons even efficiënt getarget worden door een bepaalde behandelingsstrategie, of dat er wellicht bepaalde subkloons achterblijven na behandeling.

Een aantal voorbeelden van specifieke vragen die we in het onderzoeksproject willen gaan onderzoeken, en die deels via dier experimenten bestudeerd gaan worden zijn:

- hoe heterogeen is de tumorcelpopulatie in de diagnose monsters, dus voorafgaande aan de therapie, m.a.w. hoeveel subgroepen (klonen) zijn er aanwezig en in welke verhouding en welke zijn transplanteerbaar in het muizenmodel?
- Is er verschil tussen de subgroepen die in de "hu-scaffold" setting uitgroeien in vergelijking met het IV model zonder scaffolds waarin humane cytokines tot expressie komen (NSG-SGM3, MISTRG)?
- Is er een verdere verbetering van het "hu-scaffold" model wanneer de scaffolds geïmplant worden in muizen waarin humane cytokines tot expressie komen (NSG-SGM3, MISTRG)?
- hoe onderscheiden de verschillende klonen zich ten opzichte van elkaar, i.e., wat is hun genetische en fenotypische profiel?
- hoe verandert deze onder invloed van de toegediende chemotherapie (resulterend in de "klonale getijden"); m.a.w. in hoeverre waren de resistente klonen reeds aanwezig bij aanvang van de therapie (dus in het uitgangsmateriaal), in hoeverre zijn ze door de gegeven behandeling uitgeselecteerd?
- zijn er overeenkomsten tussen patiënten? m.a.w. komen bepaalde genetische veranderingen bij meerdere patiënten binnen een subgroep voor?
- zijn deze afwijkingen te koppelen met het resistentie profiel en de toegepaste therapie?
- kunnen we, uiteindelijk, op grond van reeds bij diagnose vastgestelde afwijkingen in de tumorcellen, al bij aanvang van de therapie een betere keuze maken m.b.t. het "optimale" medicijn voor de betreffende patiënt? Ook wel aangeduid met "personalized treatment"?
- bij het onderdeel antilichaam-gebaseerde immunotherapie zullen immunoliposomen worden getest met aan de buitenkant antilichamen tegen specifieke leukemische stamcel targets getest om zo drugs specifiek naar leukemische stamcellen te sturen. De effectiviteit van deze therapie zal vergeleken worden met cellulaire immuuntherapie waarin T cellen met d.m.v. biotechnologie geconstrueerde chimere antigen receptoren (CAR-T cellen) zullen worden gebruikt om leukemische stamcellen te targeten.

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

| Volgnummer | Type dierproef                                                                                      |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1          | Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethodes te kunnen verbeteren. |
| 2          |                                                                                                     |
| 3          |                                                                                                     |
| 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

| 1.1        | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.                                                              | 10500                                                                                                                                                                                             |            |                |   |                                                                                                     |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.2        | Vul de naam van de instelling of organisatie in.                                                    | Rijksuniversiteit Groningen                                                                                                                                                                       |            |                |   |                                                                                                     |
| 1.3        | Vul het volgnummer en het type dierproef in.                                                        | <table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>1</td><td>Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethodes te kunnen verbeteren.</td></tr></table> | Volgnummer | Type dierproef | 1 | Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethodes te kunnen verbeteren. |
| Volgnummer | Type dierproef                                                                                      |                                                                                                                                                                                                   |            |                |   |                                                                                                     |
| 1          | Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethodes te kunnen verbeteren. |                                                                                                                                                                                                   |            |                |   |                                                                                                     |

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

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Op dit moment is in het onderzoek naar leukemie het gebruik van muizen modellen een van de meest geavanceerde manieren om inzicht te verkrijgen in de verloop, kinetiek en behandelbaarheid van deze erg heterogene ziekte. Daarom wordt in ons lab ervoor gekozen om met behulp van immunodeficiënte muizen modellen (NOD-Scid of Rag gebaseerd) de ziekte verloop in de patiënt na te bootsen.

Het onderzoek zal bestaan uit drie onderdelen:

1. Het laten uitgroeien van primaire tumorcellen afkomstig uit bloed of beenmergmonsters van patiënten met verschillende vormen van hematologische maligniteiten (o.a. leukemie en myeloom) in een gehumaniseerde hematopoietische "niche" in muizen ("hu-scaffold").
2. Het zoeken naar doel genen (target genen) die een gespecialiseerde behandeling van de verschillende hematologische maligniteiten mogelijk maken en/of bevorderen met als doel het behandelen van de ziektebeelden in de muis en later de mens. Hierbij zijn ook veranderingen in de beenmergomgeving (hematopoietische niche) in de oorspronkelijke patiënten en de interactie van tumorcellen met deze al dan niet veranderde niche van groot belang.
3. Het uitvoeren van een drug screen met verschillende veelbelovende therapeutische middelen zoals "small molecules", monoclonale antilichamen, nieuwe vormen van cellulaire immuuntherapie, klassieke chemotherapie en combinaties hiervan.

Voor deze studies maken we gebruik van humane scaffold ("hu-scaffold") muizen waarbij een gehumaniseerde hematopoietische "niche" wordt gecreëerd in immuun deficiënte muizen, een model dat we in de afgelopen jaren succesvol hebben opgezet in ons lab

[REDACTED]). 4 keramische scaffolds (dragermateriaal bestaande uit tri-calciumfosfaat) worden gecoat met humane mesenchymale stromale cellen (MSCs) subcutaan met een mix van matrigel op de flanken van de muis geïmplant. Deze stamcellen ontwikkelen tot bot en bijbehorend stromaal weefsel in en om de "scaffolds" na implantatie in de muis. Deze "hu-scaffold modellen" zijn uniek vanwege het feit dat wanneer primair materiaal van hematologische tumoren (d.w.z. direct van patiënten afkomstig) hierin geïnjecteerd wordt, dat de gecreëerde humane omgeving de uitgroei van deze primaire tumorcellen ondersteunt. Dit is een groot voordeel ten opzichte van het IV model, omdat ook cellen die in de IV setting niet uitgroeien in het "hu-scaffold" model succesvol zijn ([REDACTED]).

Naast ons gehumaniseerde muismodel zijn er de laatste jaren ook een aantal verschillende xenograft muizenmodellen gegenereerd waarin humane groeifactoren tot expressie gebracht worden. Dit betreft bijvoorbeeld NSG-SGM3 waarin humaan SCF, IL3 en GM-CSF tot expressie komen (Wunderlich et al, Leukemia 2010), en MISTRG muizen waarin humaan M-CSF, IL3/GM-CSF, TPO, and SIRPα tot expressie komen (Rongvaux et al, Nature Biotechnology 2014). In een vergelijkende studie willen we graag deze muizen vergelijken met onze humane scaffold muizen, en uiteindelijk zouden we ook graag onze scaffolds willen testen in deze humane cytokine muizen omdat te bestuderen in hoeverre dat nog een verdere verbetering van het humane scaffold model geeft.

Hoewel we hebben kunnen laten zien dat voor veel leukemische subtypen een humane omgeving essentieel is voor leukemie ontwikkeling in vivo, is het voor sommige andere subtypen minder van belang, en om deze subtypen te bestuderen zal een standaard IV injectie in muizen zonder humane scaffold afdoende zijn.

### **Primaire uitkomstparameters**

1. Na het injecteren van de tumorcellen in de hu-scaffolds is de belangrijkste parameter: "tumor groei ja of nee", naast de vraag of er ook circulerende tumorcellen in het bloed of andere organen aanwezig zijn. Het bloed wordt hierop eens in de 3 weken d.m.v. submandibulaire punctie gecontroleerd.
2. Vervolgens worden de groeiende tumoren gemeten m.b.v. een schuifmaat: niet alleen om groeisnelheid te bepalen, maar mede om op basis van tumorvolume het moment van bereiken van het humane eindpunt te kunnen bepalen en het experiment te kunnen stoppen. Dit geldt ook voor het percentage van leukemische cellen in het perifere bloed, die regelmatig (elke 3 weken) wordt gemeten om een goed tijdstip voor het humane eindpunt te kunnen bepalen.
3. Tijdens het volgen van de tumor groei zullen de muizen, kort na de detectie van de tumor en vlak voor terminatie, ook een MRI scan ondergaan om ook visueel een begin een eindpunt op te nemen en eventuele atypische uitgroei naar de borst-/ buikholte tijdig te detecteren. In het geval van een behandeling kan nog voor een derde scan voor de start van de toediening van therapie worden gekozen om een eventuele afname van het tumor volume nauwkeurig in correlatie met de laatste "terminale" scan te kunnen berekenen.
4. Tenslotte zal, gebruikmakend van de geogoste tumor cellen, een uitgebreide analyse van de tumoren en de muize-compartimenten (bloed, beenmerg, milt en lever) uitgevoerd worden, zowel genetisch (DNA/RNA analyse), met FACS, immunohistochemische analyse van de tumor in situ en *in vitro* assays. Levende cellen zullen worden opgeslagen in onze biobank voor seriële transplantaties of andere vervolg studies.

Al deze analyses zijn reeds door ons beproefde methoden die routinematig worden uitgevoerd.

Voordat gestart wordt met behandelingsexperimenten in vivo experimenten zal eerst worden vastgesteld of een bepaalde behandeling effectief is in vitro zoals in de project aanvraag in detail beschreven. Op basis van deze in vitro gegevens kan dan een behandelplan worden opgesteld voor een specifieke behandeling van de verschillende hematopoietische maligniteiten waarvan wij in onze "muizen kliniek" model dieren genereren door middel van moderne therapieën zoals hierboven genoemd.

---

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

De muizen die alleen een IV injectie ondergaan zullen 24 uur voor de injecties een bestraling van maximaal 2Gy ondergaan om de "homing" van de cellen te bevorderen. Verder zullen de dieren de volgende dag een IV injectie ontvangen. Vanaf een periode van 4 tot 6 weken na injectie zullen de bloedafnames beginnen. Bloedafnames worden altijd via de wangprik zonder verdoving (submandibulaire punctuur) gedaan met een

interval van 3-4 weken afhankelijk van de kinetiek van het patiënten of model sample. Als er een percentage van 50% humane cellen in het bloed wordt benadert dan worden de dieren humaan via cervicale dislocatie onder isofluraan anesthesie getermineerd.

De muizen die worden voorzien van solide "hu-scaffolds" worden onder isofluraan anesthesie geopereerd. De preoperatieve pijnstilling is buprenorfine 0,1 mg/kg lichaamsgewicht en de scaffolds (4 per dier) worden in subcutane pockets aan beide flanken van de muis geïmplant. Dit wordt gedaan door een incisie per 2 subcutane pockets in het midden van de rug te plaatsen en de pockets vanuit deze positie aan de linker en rechter kant van de incisie te plaatsen. De bovenste twee implantaten zullen dan ter hoogte van het hart zitten en de onderste twee ter hoogte van de nieren. Scaffolds worden geïmplant samen met matrigel welke binnen enkele minuten zal uitharden tot een rubberachtige substantie, dit is het uiteindelijke implantaat.

Wondjes worden gelijmd met weefsel lijm en de dieren worden tijdelijk solitair gehouden om het genezen te versnellen. Deze muizen zullen 6-8 weken na implantatie de (maligne) hematopoietische cellen via een in de "hu-scaffold" geplaatste subcutane injectie ontvangen.

Vanaf een periode van 4 tot 6 weken na injectie zullen de bloedafnames beginnen. Bloedafnames worden altijd via de wangprik zonder verdoving (submandibulaire punctuur) gedaan met een interval van 3-4 weken afhankelijk van de kinetiek van het patiënten of model sample. Bij deze 3-4 wekelijkse bloedafnames (submandibulaire punctuur) wordt <10% TBV (totaal bloed volume) van de muis afgenomen. Uitgaande van een totaal bloedvolume van 1,46ml bij een muis van 25 gram ( $58,5 \text{ ml/kg} \times 0.025 \text{ kg} = 1,46 \text{ ml}$ ) wordt er dan ook voor gezorgd dat er per bloed afname niet meer dan 100ul (6,85%) af wordt genomen. Hierdoor zal de muis weinig hinder ondervinden van het bloedverlies en de afgenomen hoeveelheid snel weer aan kunnen maken. Als er een percentage van 50% humane cellen in het bloed of een totaal tumor volume op de "hu-scaffolds" van  $2\text{cm}^3$  wordt benadert dan worden de dieren humaan via cervicale dislocatie onder isofluraan anesthesie getermineerd. Tumor volume wordt minimaal wekelijks bepaald door regelmatige uitwendige meting met een schuifmaat onder het gebruik van de aangepaste elliptische formule ( $L \times B^2 \times 0,5$ ). Tijdens het hele experiment worden de dieren regelmatig (1xweek) gewogen.

Om het volgen van de tumor groei te verbeteren en meer inzicht in de groeikinetiek te verkrijgen zullen de "hu-scaffold" dieren ook maximaal 3 MRI scans (MR imaging) ondergaan. De eerste scan wordt kort na de detectie van de beginnende tumor gedaan en de tweede kort voor de terminatie van het dier. Een eventuele derde scan zou net voor het begin van een eventuele therapie worden gedaan om een mogelijke vermindering van het tumor volume tot de laatste scan voor de terminatie van het dier nauwkeurig te kunnen documenteren. Ook willen wij graag de mogelijkheden van bioluminescentie (in het verleden toegepast) en "near IR optical imaging" in deze setting verder bestuderen en optimaliseren, gezien beide technieken niet invasief en weinig belastend voor de muizen zijn en ons naast de MRI een gedetailleerd overzicht van de situatie in de muis tijdens de tumor ontwikkeling kunnen geven.

Deze experimentele aanpak heeft in het verleden al goede en betrouwbare resultaten met zo min mogelijk ongerief voor de dieren opgeleverd.

Inhibitors en drugs zullen via intraperitoneale, intraveneuze of intrascaffold routes toegediend worden, of waar mogelijk via het drinkwater of voedsel. Per toediening zal niet meer dan de maximaal toegestane volume toegediend worden waarbij gelet zal worden op het vehicle. De frequentie van toediening zal bepaald worden door de drug die wordt gebruikt om zo klinisch relevant mogelijk te werken. Toediening van drugs vindt gewoonlijk plaats over een periode van 1-4 weken.

---

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

Een belangrijke overweging bij het inschatten van het aantal dieren dat voor dit onderdeel van het project nodig is, is het gegeven dat van elk van de hoofdtypen hematologische maligniteiten (te weten Acute Myeloïde Leukemie (AML), Acute lymfatische Leukemie (ALL), Chronische Myeloïde Leukemie (CL), Lymfoom (L) en Myelodysplastisch syndroom (MDS)) verscheidene subgroepen onderscheiden kunnen worden.

Om een goed overzicht te krijgen van de karakteristieken van elk van de patiëntengroepen en om een goede representatie van elk van de subtypen in de biobank te krijgen, moeten er per subtype een groot aantal patiënten worden onderzocht. Ook binnen AML, ALL, CML, L en MDS kunnen weer subgroepen worden onderscheiden op basis van specifieke genetische afwijkingen. Ons streven is om in totaal zo'n 75

---



verschillende patiënten groepen in de muizenkliniek gerepresenteerd te hebben (40 AML, 10 ALL, 5 CML, 10 L, 10 MDS). Elke tumor zal anders zijn en de variatie is van tevoren niet bekend, daarom zullen per subgroep meerdere samples geïncubeerd worden.

Na engraftment in muizen zullen levende cellen kunnen worden bewaard in onze biobank voor verder karakterisatie en secundaire transplantatie om zo specifieke therapieën te kunnen uittesten.

Op basis van onze voorgaande studies weten we dat de kans dat de tumorcellen van patiënten in het hu-scaffold model uitgroeien voor AML en CML heel groot is (>95%), voor MDS >50% en voor L hebben we nog niet voldoende ervaring.

De groei van tumoren en de effecten van drugs hierop zal in twee onafhankelijke pilot experimenten geanalyseerd worden. Als significantie bereikt is zullen geen verder proeven meer gedaan worden, maar als er verschil is tussen de twee experimenten wordt er mogelijk nog een experiment gedaan.

---

## B. De dieren

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

Voor onze proeven gebruiken wij uitsluitend immuun-deficiënte, vrouwelijke muizen.

Tot nu toe hebben wij de NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ stam (NSG) met succes gebruikt en zouden dit ook graag verder doen. Echter staan wij natuurlijk ook stil bij de continue ontwikkeling van nieuwe immuundeficiënte muizen modellen zoals bij voorbeeld de MISTRG stam (C;129S4-Rag2<sup>tm1.1Flv</sup> Csf1<sup>tm1(CSF1)Flv</sup> Csf2/Il3<sup>tm1.1(CSF2,IL3)Flv</sup> Thpo<sup>tm1.1(TPO)Flv</sup> Il2rg<sup>tm1.1Flv</sup> Tg(SIRPA)1Flv/J; <https://www.jax.org/strain/017712>) of de NSG<sup>TM</sup>-SGM3 stam (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl Tg(CMV-IL3,CSF2,KITLG)1Eav/MloySzJ; <https://www.jax.org/strain/013062>).

Wij willen graag de mogelijkheid behouden om in het geval van een nieuwe en geoptimaliseerde stam een pilot experiment met een aantal bewezen patiënten samples te doen om te evalueren of deze dieren geschikt zijn voor ons onderzoek en betrouwbare en indien mogelijk zelfs verbeterde resultaten ten opzichte van de NSG muis opleveren.

Deze optie lijkt ons vooral belangrijk omdat het project voor 5 jaar is gepland en in deze tijd veel nieuwe ontwikkelingen kunnen ontstaan. Hierdoor zou het overstappen op een andere muizen stam potentieel nodig kunnen zijn om de allerbeste resultaten te bereiken.

Het gebruik van vrouwtjes is erop gebaseerd dat deze een betere "engraftment" van hematopoietische maligne cellen vertonen (McDermott *et al*, 2010) en op de betere verdraagzaamheid van vrouwtjes in groepshuisvesting.

Gebaseerd op het gebruik van dieren in het verleden en de beschikbaarheid van patiënten materiaal zouden wij graag de volgende aantallen aan willen vragen:

### Onderdeel bio-banking:

Met gemiddeld 75 te onderzoeken leukemie subgroepen, met 5 muizen per monster komt het aantal muizen voor de duur van het project op 375. Uit onze ervaring van de afgelopen jaren blijkt dat 5 dieren per groep nodig is om reproduceerbare resultaten te genereren (rekening houdend met variatie tussen individuele muizen, foutenmarge bij het injecteren van cellen). Dit is van belang om alle leukemie subtypen voldoende gerepresenteerd te hebben.

### Onderdeel target genen:

Gebaseerd op ons gebruik in het verleden gaan wij ervan uit dat wij in elk geval 30 nieuwe diersmodellen met onze target genen zullen ontwikkelen in de volgende 5 jaar. Per nieuw model gaan wij van 5 dieren uit. Omdat het nog niet zeker is dat wij ook het fenotype van de nagebootste hematologische maligniteit kunnen bereiken in de muis zullen deze experimenten dan ook als pilot experimenten worden beschouwd. Uit onze ervaring van de afgelopen jaren blijkt dat 5 dieren per groep nodig is om reproduceerbare resultaten te genereren (rekening houdend met variatie tussen individuele muizen, foutenmarge bij het injecteren van cellen). Met deze berekening komen wij dan op 150 dieren in 5 jaar voor deze experimenten.

### Onderdeel drugscreen:

Voor de drugscreening zullen wij de succesvolle patiënten samples uit de biobank als secundair model gebruiken. Per groep zullen 5 muizen, met elk 4 scaffolds, geïncubeerd worden, dus 5 in de controle arm en 5 in de behandelingsarm. Waar mogelijk zullen verschillende behandelingen in 1 experimenten geïncubeerd worden zodat er maar 1 controle groep van 5 muizen nodig is. Voor een representatief experiment inclusief controles en verschillende concentraties inhibitors zullen 30 muizen nodig zijn.

In plaats van Immunoliposomen zullen ook CAR-T cellen getest worden, of in plaats van small molecule

---

inhibitors zullen ook conventionele therapieën (chemotherapeutica) getest worden. Binnen een periode van 5 jaar schatten we dat we in totaal 3 verschillende drugscreen experimenten zoals hierboven beschreven zullen uitvoeren, in duplo, op een totaal van 10 verschillende leukemie modellen. In totaal zullen hiervoor dus nodig zijn: 3 (drugscreen modellen) x 2 (duplo) x 30 muizen (per screen) x 10 leukemie modellen = 1800 dieren in 5 jaar.

De groei van tumoren en de effecten van drugs hierop zal dus in twee onafhankelijke pilot experimenten geanalyseerd worden. Als significantie bereikt is zullen geen verder proeven meer gedaan worden, maar als er verschil is tussen de twee experimenten wordt er mogelijk nog een experiment gedaan.

#### **Mogelijke pilot experimenten met nieuwe stammen:**

Per jaar zouden wij graag de mogelijkheid willen hebben om 30 muizen ♀ (6-8 weken oud bij begin experiment) van een nieuwe stam (zoals MISTRG of NSG-SGM3) in pilot experimenten te gebruiken. Per 5 jaar zou dat dan op 150 muizen ♀ uitkomen.

In **totaal** zouden wij dus graag **2475 muizen** ♀ voor **5 jaar** aan willen vragen.

#### **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.

Al onze dierexperimenten worden vooraf gegaan door uitgebreide *in vitro* experimenten en continue terugkoppeling met behaalde resultaten vanuit onze eigen groep, maar ook vanuit recente publicaties uit het onderzoeksveld. Hierdoor worden geen dieren voor overbodige herhalingen gebruikt en de samples met de grootste belofte tot succes uitgekozen om een optimale verloop van de proeven te faciliteren en verspilling van dieren te voorkomen. Door de implantatie van meerdere "hu-scaffolds" (4 per muis) kan elke tumor die op het dier ontwikkeld afzonderlijk worden geanalyseerd wat het aantal dieren fors omlaag brengt. Statistische relevantie kan sneller worden bereikt door een maximum aantal van 4 uitgegroeide hematologische maligniteiten/tumoren per muis.

**Vervanging:** Gezien het feit dat het helaas niet mogelijk is om de complete systemische ontwikkeling van leukemie en andere hematopoietische maligniteiten in een *in vitro* setting na te bootsen blijven dier experimenten nodig. Dit vooral omdat het samenspel van de humane niche inclusief het vormen van bot, rekruteren van bloedvaten en ontwikkeling van een 3D omgeving ervoor zorgt dat het geobserveerde fenotype dicht bij het ziekteverloop van de mens ligt technisch niet haalbaar is in een alleen op *in vitro* data gebaseerd experiment.

**Vermindering:** Door de mogelijkheid om maximaal 4 op zichzelf staande hematologische maligniteiten/tumoren te creëren per muis, wanneer voor het "hu- scaffold" model met humane niches wordt gekozen, kan het aantal dieren dat per patiënten sample wordt benodigd enorm omlaag worden gebracht zonder statistische significantie te verliezen. Waar vroeger 4 muizen nodig waren om 4 hematologische maligniteiten/tumoren te creëren kan dit nu met behulp van een muis worden gedaan.

**Verfijning:** Door het gebruik van de humane niche blijven de hematologische maligniteiten/tumoren gelokaliseerd en worden alleen heel zelden systemisch. Hierdoor hebben de dieren weinig last van het



ziekteverloop en is de tumor groei de enige factor die voor enig ongerief kan zorgen. Alleen de dieren die ter controle van de procedure een IV injectie ontvangen hebben een kleine kans op systemische ziekte. Hierbij wordt op basis van regelmatige bloedafnames de hoeveelheid kanker cellen in het bloed (<50% als maximum) strikt gecontroleerd voor een tijdige interventie.

Verder verfijning vindt plaats door gebruik te maken van een zg 'pamperprotocol'. Na bestraling en/of operatie (implantatie) ontvangen de dieren 2 weken lang elke dag een aanvullend dieet naast hun *ad libitum* beschikbare standaard brok en drinkwater. Dit dieet is een met water aangemaakt papje (RM Convalescence+ BG SY (M) + standaard brok in poedervorm 1:1) en heeft een hoog energiegehalte om het herstel te bespoedigen en gewichtsverlies te voorkomen. Door de zachte consistentie en de formulering is het makkelijk te eten en te verteren. Verder ontvangen de dieren twee weken na bestraling ook nog drinkwater met antibioticum (Neomycine, 3.5 gr/l) omdat de dieren in deze periode extra kwetsbaar zijn.

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.

Humane eindpunten: De dieren worden nauwlettend in de gaten gehouden en naast de regelmatige bloedafnames om de hoeveelheid leukemiecellen in het bloed te bepalen worden ook gewicht, gedrag en eventueel tumor volume gecontroleerd. De tumoren worden 1-2 keer wekelijks met behulp van een schuifmaat uitwendig opgemeten om te voorkomen dat de massa de toelaatbare grens overschrijdt. Ook de MRI scan aan het begin en einde van de tumorontwikkeling draagt bij aan nauwgezette monitoring van de situatie in de muis. De dieren worden altijd ruim op tijd humaan getermineerd. Dit gebeurt door middel van cervicale dislocatie onder isofluraan anesthesie. Voor verdere uitleg van specifieke parameters zie specificatie paragraaf J.

## 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.

Deze dierproeven zijn niet eerder uitgevoerd. De patiënten samples die wij in de experimenten testen zijn uniek en worden niet ook elders getest. Het gehumaniseerde scaffold model zelf is uniek en er is nogal wat specifieke ervaring voor nodig om dit met succes toe te passen. Die is in onze groep aanwezig, aangezien we specifiek hiervoor zijn getraind door de groep die dit model heeft ontwikkeld en de procedure al jaren met succes uitvoeren en optimaliseren. We zijn in regelmatig contact met deze groep om herhaling te voorkomen en het onderzoek te stroomlijnen.

## 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.

Voorafgaande aan de subcutane implantaties van de "scaffolds" ontvangen de dieren eenmalig een subcutane injectie van buprenorfine 0,1 mg/kg lichaamsgewicht. Het zelfde geldt voor een mogelijke *intra femorale* beenmerg aspiratie.

Operaties, injecties voor het verkrijgen van "hu-scaffolds" volgens methode 2, beenmerg aspiraties, MRI scans en terminatie worden altijd onder Isofluraan anesthesie uitgevoerd in overeenkomst met onze humane eindpunten.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Tumor kan groeien en ongerief veroorzaken

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Tumorgroei

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

Bij een teveel aan ongerief zal de muis getermineerd worden.

### J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Verwachte eindpunten: Wanneer de muizen een percentage van 50% humane leukemische cellen in het bloed of een totaal tumor volume van maximaal 2cm<sup>3</sup> (conform Code Of Practise) naderen worden deze humaan getermineerd door middel van cervicale dislocatie onder isofluraan anesthesie.

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

Ervaringen uit het verleden laten zien dat een uitval percentage van onder de 5% een reële schatting zou zijn.

### 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.

Op basis van de strenge bewaking van het welzijn van de dieren zal het ongerief matig zijn. Dit is dan gebaseerd op de operaties/en of bestraling van de dieren als hoogste ongerief.

## Einde experiment

**L. Wijze van doden**

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

☐ Nee

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

Het termineren van de muizen aan het einde of als onderdeel van de proef is nodig omdat de organen, het beenmerg en het bloed van de muizen op het lab opgewerkt en geanalyseerd moet worden. Dit is ook erg belangrijk voor het onderdeel "biobanking".

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

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

☒ Ja

# Format DEC-advies

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

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

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **8079**
  2. Titel van het project: **Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten**
  3. Titel van de NTS: **Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethododes te kunnen verbeteren**
  4. Type aanvraag:
    - ☐ **nieuwe aanvraag projectvergunning**
  5. Contactgegevens DEC:
    - naam DEC: **DEC-RUG**
    - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
    - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
  6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
    - ☐ ontvangen door DEC: **11-01-2017**
    - ☐ aanvraag compleet: **11-01-2017**
    - ☐ in vergadering besproken: **19-01-2017**
    - ☐ anderszins behandeld: **24-01-2017**
    - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: **20-01-2017 tot 24-01-2017**
    - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
    - ☐ aanpassing aanvraag: **24-01-2017**
    - ☐ advies aan CCD: **02-02-2017, aangepast 16-02-2017**
  7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.  
**De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.**
- Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.*
8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
    - Datum
    - Plaats
    - Aantal aanwezige DEC-leden
    - Aanwezige (namens) aanvrager
    - Gestelde vraag / vragen
    - Verstrekt(e) antwoord(en)
    - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **20-01-2017**

**Gestelde vraag/vragen:**

- 1/ Gelieve in de bijlage de limiet aan de totale bloedafname middels de 3-4 wekelijkse bloedafnames (submandibulaire punctuur) te kwantificeren.
- 2/ Het gebruik van 5 dieren per groep zou nader onderbouwd moeten worden.
- 3/ U stelt onder B. De dieren: 'Als significantie bereikt is zullen geen verder proeven meer gedaan worden. De DEC vraagt zich af dit een juiste benadering is. Zou het niet beter zijn om de vraagstelling met een vooraf bepaalde power te benaderen?
- 4/ De experimenten zullen bij vrouwtjes uitgevoerd worden. Zijn er verschillen te verwachten tussen mannen en vrouwen? Zullen de bevindingen uit de experimenten algemeen geldend zijn bij gebruik van enkel vrouwtjes c.q. zijn ze te generaliseren?

- Datum antwoord: **24-01-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

- 1/ Dit is nu toegevoegd in de bijlage, pagina 3
- 2/ Dit is gebaseerd op onze ervaring in het verleden. We hebben de volgende zin toegevoegd, pagina 4 onderdeel biobanking, onderdeel target genen:
  - Uit onze ervaring van de afgelopen jaren blijkt dat 5 dieren per groep nodig is om reproduceerbare resultaten te genereren (rekening houdend met variatie tussen individuele muizen, foutenmarge bij het injecteren van cellen).
- 3/ Aangezien het pilotexperimenten betreft is het lastig om vooraf een poweranalyse te doen. Dit staat ook zo vermeld op pagina 5. Zo hebben we onze experimenten in het verleden ook altijd gedaan, en zien niet goed in hoe we dat nu anders zouden kunnen formuleren.
- 4/ Zoals al in de aanvraag vermeldt is het gebruik van vrouwtjes erop gebaseerd dat deze een betere "engraftment" van hematopoïetische (maligne) cellen vertonen (Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains; McDermott et al, 2010) en op de betere verdraagzaamheid van vrouwtjes in groepshuisvesting.
- In boven genoemde paper is ook de "engraftment" van de mannetjes beschreven. Tussen de geslachten werd vastgesteld dat vrouwtjes 1,4 keer betere "engraftment" vertonden als er meer dan 5000 cellen werden geïnjecteerd. Bij een lagere hoeveelheid cellen kon dat verschil oplopen tot 11 keer betere "engraftment" bij NSG vrouwtjes ten opzichte van NSG mannetjes, ondanks dat de NSG mannetjes ook duidelijke "engraftment" vertonden.
- Uitgaande van deze informatie is alleen voor het diermodel het vrouwtje een handigere keuze, door snellere en duidelijker resultaten en kunnen de gegevens ook vertaald worden naar de mannelijke muis. Uiteindelijk zijn de resultaten dus zeker te generaliseren.
- **De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag**

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

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

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? **Ja**
2. Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.  
*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*

3. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**

4. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**

5. 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 doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC vertrouwt erop 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. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet).

**Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.**

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

### *Belangen en waarden*

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

**Het directe doel is 1/ meer inzicht te krijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van leukemie en de ontwikkeling van resistentie tegen bestaande therapieën, en 2/om betere behandelmethoden tegen leukemie te kunnen ontwikkelen. Bovenstaande met gebruikmaking van het *in vivo* xenograft muismodel. Het uiteindelijke doel is om tot betere behandelmethoden te komen voor leukemie patiënten.**

**Er is deels een directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel want uit patiënten geïsoleerde leukemie cellen zullen worden getest in het muizenmodel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel**

**en translationeel onderzoek m.b.t. de hierboven beschreven (directe) doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.**

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

**De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele/translationele project, wat gericht is op onderzoek naar mechanismen bij het ontstaan van leukemie, ontwikkeling van resistentie tegen bestaande therapieën, en mogelijke betere behandelmethoden tegen leukemie in een *in vivo* xenograft model, zijn de proefdieren, en de doelgroep/patiënt en diens naasten.**

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

**Waarden die voor patiënten bevorderd kunnen worden: de gezondheid en levensverwachting van patiënten kan hierdoor verbeterd worden. Ook kan de kwaliteit van leven verbeterd worden van patiënten en van hun naasten.**

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.

**Voor zover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.**

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*). **Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output alsmede de aandacht voor de drie V's**
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). **De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.**

#### *Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor



voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **N.v.t.**

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

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

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*). **De integriteit van het dier wordt aangetast door bestraling, injectie van inhibitor (drugs) en maligne hematopoietische cellen, bloedafnames, scaffold implantatie en opoffering.**

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

**Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig aangegeven in de projectaanvraag.**

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De complexe omstandigheden voor leukemie ontwikkeling en behandeling (c.q. ontwikkeling van resistentie) zijn alleen na te bootsen in een gehumaniseerd muizenmodel.**

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

**Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties.**

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

**De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.**

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

**Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.**

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

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

**In onderhavige projectaanvraag worden vrouwelijke dieren gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd. Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.**

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

**Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de**

**projectaanvraag door de aanvrager.**

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

*NTS*

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

**Naar de mening van de DEC is zulks het geval.**

**D. Ethische afweging.**

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten", dat gericht is op de verbetering van de behandelmethoden van leukemie bij mensen en daarmee de vergroting van de kans op genezing bij dergelijke patiënten het matige ongerief, dat ongeveer 80% van de muizen wordt aangedaan dan wel licht ongerief bij de overige dieren in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **matig nadeel.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **potentieel groot voordeel.**

Algemeen: **vergroting van medische kennis met betrekking tot het ontstaan van leukemie en de behandeling daarvan, leidend tot een verbeterde gezondheidszorg.**

De DEC-RuG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na licht dan wel matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door het toedienen van maligne cellen al dan niet in combinatie met een scaffold, monitoring middels MRI en herhaalde bloedafname, het toepassen van conventionele en experimentele behandelingen en de opoffering aan het eind van de proeven. Dit zal ook repercussies hebben op hun natuurlijke gedrag.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een relevante uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het ontstaan van leukemie. Voor de betreffende patiënten is verbetering van hun welzijn en mogelijk uitzicht op genezing van leukemie van groot belang. Dit verhoogt hun levensverwachting en geeft een betere kwaliteit van leven.

Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk, translationeel als vanuit maatschappelijk oogpunt, van reëel belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere

behandelmethode te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten”, dat gericht is op de verbetering van de behandeling van leukemie, de opoffering en het lichte dan wel matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project bevestigend. Hoewel de DEC-RuG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergaan ongerief van de proefdieren, weegt het reële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-RuG is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-RuG is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-RuG is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-RuG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel “Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten” als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RuG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

## E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

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

**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*).

**N.v.t. De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.**

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 16 februari 2017 16:25  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** RE: Aanvraag AVD105002017855: aanvullend advies  
**Bijlagen:** DEC advies 8079 [REDACTED] 160217.pdf

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Het betreft hier (inderdaad) een fout. Hierbij stuur ik een aangepast advies met daarin de correcte formuleringen

Het advies is versleuteld met Filesecure

Vriendelijke groeten,

[REDACTED]  
Secretaris DEC-RUG

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** woensdag 15 februari 2017 17:49  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** Aanvraag AVD105002017855: aanvullend advies

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag in behandeling waarover u advies heeft gegeven, te weten AVD105002017855.

Wij hebben een vraag naar aanleiding van uw advies:

-Uw antwoorden bij vragen C2 en C6 zijn niet geheel duidelijk. U geeft namelijk het volgende aan: '.....is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding').....'  
U wordt verzocht dit te verhelderen.

Wij ontvangen graag de aanvullingen op uw advies.

Met vriendelijke groet,

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

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

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

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

# Format DEC-advies

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

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

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: Interne RUG code **8079**
  2. Titel van het project: **Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten**
  3. Titel van de NTS: **Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethododes te kunnen verbeteren**
  4. Type aanvraag:
    - ☐ **nieuwe aanvraag projectvergunning**
  5. Contactgegevens DEC:
    - naam DEC: **DEC-RUG**
    - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
    - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
  6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
    - ☐ ontvangen door DEC: **11-01-2017**
    - ☐ aanvraag compleet: **11-01-2017**
    - ☐ in vergadering besproken: **19-01-2017**
    - ☐ anderszins behandeld: **24-01-2017**
    - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: **20-01-2017 tot 24-01-2017**
    - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
    - ☐ aanpassing aanvraag: **24-01-2017**
    - ☐ advies aan CCD: **02-02-2017**
  7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.  
**De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.**
- Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.*
8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
    - Datum
    - Plaats
    - Aantal aanwezige DEC-leden
    - Aanwezige (namens) aanvrager
    - Gestelde vraag / vragen
    - Verstrekt(e) antwoord(en)
    - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **20-01-2017**

**Gestelde vraag/vragen:**

- 1/ Gelieve in de bijlage de limiet aan de totale bloedafname middels de 3-4 wekelijkse bloedafnames (submandibulaire punctuur) te kwantificeren.
- 2/ Het gebruik van 5 dieren per groep zou nader onderbouwd moeten worden.
- 3/ U stelt onder B. De dieren: 'Als significantie bereikt is zullen geen verder proeven meer gedaan worden. De DEC vraagt zich af dit een juiste benadering is. Zou het niet beter zijn om de vraagstelling met een vooraf bepaalde power te benaderen?
- 4/ De experimenten zullen bij vrouwtjes uitgevoerd worden. Zijn er verschillen te verwachten tussen mannen en vrouwen? Zullen de bevindingen uit de experimenten algemeen geldend zijn bij gebruik van enkel vrouwtjes c.q. zijn ze te generaliseren?

- Datum antwoord: **24-01-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

- 1/ Dit is nu toegevoegd in de bijlage, pagina 3
- 2/ Dit is gebaseerd op onze ervaring in het verleden. We hebben de volgende zin toegevoegd, pagina 4 onderdeel biobanking, onderdeel target genen:
  - Uit onze ervaring van de afgelopen jaren blijkt dat 5 dieren per groep nodig is om reproduceerbare resultaten te genereren (rekening houdend met variatie tussen individuele muizen, foutenmarge bij het injecteren van cellen).
- 3/ Aangezien het pilotexperimenten betreft is het lastig om vooraf een poweranalyse te doen. Dit staat ook zo vermeld op pagina 5. Zo hebben we onze experimenten in het verleden ook altijd gedaan, en zien niet goed in hoe we dat nu anders zouden kunnen formuleren.
- 4/ Zoals al in de aanvraag vermeldt is het gebruik van vrouwtjes erop gebaseerd dat deze een betere "engraftment" van hematopoietische (maligne) cellen vertonen (Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains; McDermott et al, 2010) en op de betere verdraagzaamheid van vrouwtjes in groepshuisvesting.
- In boven genoemde paper is ook de "engraftment" van de mannetjes beschreven. Tussen de geslachten werd vastgesteld dat vrouwtjes 1,4 keer betere "engraftment" vertonden als er meer dan 5000 cellen werden geïnjecteerd. Bij een lagere hoeveelheid cellen kon dat verschil oplopen tot 11 keer betere "engraftment" bij NSG vrouwtjes ten opzichte van NSG mannetjes, ondanks dat de NSG mannetjes ook duidelijke "engraftment" vertonden.
- Uitgaande van deze informatie is alleen voor het diermodel het vrouwtje een handigere keuze, door snellere en duidelijker resultaten en kunnen de gegevens ook vertaald worden naar de mannelijke muis. Uiteindelijk zijn de resultaten dus zeker te generaliseren.
- **De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag**

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

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

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? **Ja**
2. Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.  
*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*

3. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**

4. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**



5. 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 doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC vertrouwt erop 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. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet).

**Voorzover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.**

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

### *Belangen en waarden*

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

**Het directe doel is 1/ meer inzicht te krijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van leukemie en de ontwikkeling van resistentie tegen bestaande therapieën, en 2/om betere behandelmethoden tegen leukemie te kunnen ontwikkelen. Bovenstaande met gebruikmaking van het *in vivo* xenograft muismodel. Het uiteindelijke doel is om tot betere behandelmethoden te komen voor leukemie patiënten.**

**Er is deels een directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel want uit patiënten geïsoleerde leukemie cellen zullen worden getest in het muizenmodel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel**

**en translationeel onderzoek m.b.t. de hierboven beschreven (directe) doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.**

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

**De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele/translationele project, wat gericht is op onderzoek naar mechanismen bij het ontstaan van leukemie, ontwikkeling van resistentie tegen bestaande therapieën, en mogelijke betere behandelmethoden tegen leukemie in een *in vivo* xenograft model, zijn de proefdieren, en de doelgroep/patiënt en diens naasten.**

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

**Waarden die voor patiënten bevorderd kunnen worden: de gezondheid en levensverwachting van patiënten kan hierdoor verbeterd worden. Ook kan de kwaliteit van leven verbeterd worden van patiënten en van hun naasten.**

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.

**Voorzover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.**

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*). **Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output alsmede de aandacht voor de drie V's**
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). **De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.**

#### *Welzijn dieren*

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor

voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **N.v.t.**

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

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

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*). **De integriteit van het dier wordt aangetast door bestraling, injectie van inhibitor (drugs) en maligne hematopoietische cellen, bloedafnames, scaffold implantatie en opoffering.**

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

**Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig aangegeven in de projectaanvraag.**

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De complexe omstandigheden voor leukemie ontwikkeling en behandeling (c.q. ontwikkeling van resistentie) zijn alleen na te bootsen in een gehumaniseerd muizenmodel.**

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

**Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties.**

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

**De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.**

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

**Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.**

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

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

**In onderhavige projectaanvraag worden vrouwelijke dieren gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd. Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.**

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

**Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de**

**projectaanvraag door de aanvrager.**

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

*NTS*

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

**Naar de mening van de DEC is zulks het geval.**

**D. Ethische afweging.**

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten", dat gericht is op de verbetering van de behandelmethoden van leukemie bij mensen en daarmee de vergroting van de kans op genezing bij dergelijke patiënten het matige ongerief, dat ongeveer 80% van de muizen wordt aangedaan dan wel licht ongerief bij de overige dieren in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **matig nadeel.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **potentieel groot voordeel.**

Algemeen: **vergroting van medische kennis met betrekking tot het ontstaan van leukemie en de behandeling daarvan, leidend tot een verbeterde gezondheidszorg.**

De DEC-RuG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na licht dan wel matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door het toedienen van maligne cellen al dan niet in combinatie met een scaffold, monitoring middels MRI en herhaalde bloedafname, het toepassen van conventionele en experimentele behandelingen en de opoffering aan het eind van de proeven. Dit zal ook repercussies hebben op hun natuurlijke gedrag.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een relevante uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het ontstaan van leukemie. Voor de betreffende patiënten is verbetering van hun welzijn en mogelijk uitzicht op genezing van leukemie van groot belang. Dit verhoogt hun levensverwachting en geeft een betere kwaliteit van leven.

Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk, translationeel als vanuit maatschappelijk oogpunt, van reëel belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere

behandelmethode te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten”, dat gericht is op de verbetering van de behandeling van leukemie, de opoffering en het lichte dan wel matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project bevestigend. Hoewel de DEC-RuG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergaan ongerief van de proefdieren, weegt het reële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-RuG is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-RuG is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-RuG is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-RuG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel “Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten” als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RuG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

## E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

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

**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*).

**N.v.t. De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.**





## Centrale Commissie Dierproeven

8.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



02 MRT 2017

**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

AVD105002017855

**Bijlagen**

1

Datum 1 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 2 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten" met aanvraagnummer AVD105002017855. 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 "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2017 tot en met 30 april 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.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 februari 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:**  
1 maart 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD105002017855

#### **Bezwaar**

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

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

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

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

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

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

#### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1 [REDACTED]

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2017 tot en met 30 april 2022, voor het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten" met aanvraagnummer AVD105002017855, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] [REDACTED]. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

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

| Naam proef                                                                                                          | Diersoort/ Stam         | Aantal dieren | Ernst      | Opmerkingen |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------|------------|-------------|
| <b>3.4.4.1. Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethodes te kunnen verbeteren.</b> |                         |               |            |             |
|                                                                                                                     | Muizen (Mus musculus) / | 2.475         | 100% Matig |             |

### Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt 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

**Aanvraagnummer:**  
AVD105002017855

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:**

AVD105002017855

## 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:**

AVD105002017855

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.