

Inventaris Wob-verzoek W17-08										
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS 2017879	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS oud			x						
3	Projectvoorstel			x						
4	Bijlage			x						
5	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x		
6	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
7	Bijlage aangepast			x						
8	NTS nieuw	x								
9	DEC advies				x		x	x		
10	Advies CCD		x						x	
11	Beschikking en vergunning				x		x	x		

AVD 1.0800 2017 879



1.

28 FEB. 2017

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 <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: Universiteit Utrecht Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED] KvK-nummer: 30275924
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht Postbus: 12007 Postcode en plaats: 3501AA Utrecht IBAN: NL27INGB0000425267 Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters: [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. Functie: [REDACTED] Afdeling: [REDACTED] Telefoonnummer: [REDACTED] E-mailadres: [REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters: [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. Functie: Post-doc onderzoeker Afdeling: [REDACTED] Telefoonnummer: [REDACTED] E-mailadres: [REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 01 - 4 - 2017
- Einddatum 1 - 10 - 2018
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Kanker bevorderende en tumorvormende eigenschappen van genetisch aangepaste niercellen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Utrecht
- Postadres Postbus 85500 3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.035 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

Utrecht
 16-09-2017



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Kanker bevorderende en tumorvormende eigenschappen van genetisch aangepaste niercellen
1.2 Looptijd van het project	1,5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Tumor - niercel - kanker - biologische kunstnier - veiligheidsstudie

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Er is een grote behoefte aan een biologische-kunstnier. Mensen met een ernstige ziekte waarbij de nier faalt, zijn op dit moment afhankelijk van twee behandelmethoden; niertransplantatie of nierdialyse. Een niertransplantatie is de beste behandeling, maar de gemiddelde wachttijd voor een nier is lang, ruim 3 jaar, en de kwaliteit van leven is slecht waardoor sommige patiënten niet op tijd kunnen worden geholpen. Na transplantatie zal de patient bovendien medicijnen moeten slikken om de kans op afstoting van het donororgaan te beperken, wat veel bijwerkingen met zich mee brengt. De meeste patiënten ondergaan nierdialyse, een behandelmethode dat ongeveer 20% van de schadelijke stoffen uit het lichaam kan halen, maar 80% dus niet waardoor deze stoffen zich in het lichaam ophopen en verantwoordelijk zijn voor heftige bijwerkingen, zoals vermoeidheid en een groot risico op hart- en vaatziekten. Veel patiënten zeggen 'dialyseren is geen leven maar
---	---

overleven'.

Een mogelijke uitkomst is de biologische-kunstnier. Dit is een kunstnier die van binnen bekleed is met menselijke niercellen die ervoor zorgen dat de overgebleven afvalstoffen ook verwijderd kunnen worden. Deze cellen zijn genetisch aangepast zodat ze in het laboratorium op grote schaal gekweekt kunnen worden waarna ze in de kunstnier gebracht worden. Deze kunstnier wordt net als dialyse buiten het lichaam aangesloten op de bloedbaan. We verwachten dat een afweerreactie niet zal plaatsvinden, dus ook het gebruik van extra medicijnen tegen afstoting zal niet nodig zijn.

In dit project wordt de veiligheid van deze genetisch aangepaste menselijke niercellen onderzocht wanneer zij in een levend organisme terecht komen. Onderzocht wordt of deze cellen direct tumoren kunnen vormen, en of de inhoud van deze cellen op een indirecte manier kankerbevorderende eigenschappen heeft. Het betreft dus een veiligheidsstudie.

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

De opbrengst is dat we een uitspraak kunnen doen over de veiligheid van deze niercellen in de biologische-kunstnier. Een antwoord op de vraag: brengt het in contact komen met deze cellen een hoger risico op kanker met zich mee, of niet?, is voor vervolgonderzoek essentieel. Als de biologische-kunstnier werkt en vooral veilig is, kunnen veel nierpatienten behandeld worden en wordt de kwaliteit van leven van deze patienten bovendien sterk verbeterd.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

In dit project worden maximaal 80 ratten gebruikt.

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

In sommige dieren kunnen tumoren ontstaan en kan zich kanker ontwikkelen. In deze dieren kan het ongerief bestaan uit ongemak door localisatie van de tumor, angst, algehele malaise en mogelijk pijn, ontsteking, diarree/verstopping of uitvalsverschijnselen. Dit zal maximaal tot matig ongerief worden beperkt.

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

Dit project bestaat uit 1 experiment dat tweemaal onafhankelijk wordt uitgevoerd met daarin vier verschillende behandelgroepen.

De eerste behandelgroep is de positieve controlegroep. Deze groep wordt behandeld met cellen waarvan bekend is dat zij tumoren veroorzaken. Het ongerief voor deze groep wordt daarom ingeschat als ernstig.

De tweede behandelgroep is de negatieve controle. Deze groep wordt alleen behandeld met een zoutoplossing. In deze groep verwachten wij geen ongerief.

De derde behandelgroep wordt behandeld met onze niercellen. We delen deze groep in in de categorie ernstig ongerief omdat er een kans is dat deze cellen tumoren kunnen vormen.

De vierde behandelgroep wordt behandeld met de celinhoud van onze niercellen. Het kan zijn dat niet de cellen zelf, maar deeltjes die door de cellen worden geproduceerd aanleiding geven tot tumoren of kanker. Ook deze behandelgroep wordt in de categorie ernstig ongerief ingedeeld.

Samengevat, is er sprake van 25% licht ongerief en mogelijk 75% ernstig ongerief.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden na afloop geëuthanaseerd om de dieren te kunnen onderzoeken op aanwezigheid van tumoren of kankercellen. Hiervoor zullen

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

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

Er heeft al een groot aantal proefdiervrije onderzoeken naar deze cellen plaatsgevonden in het laboratorium. We hebben aan kunnen tonen dat de cellen geen afweerreactie veroorzaken. Daarnaast hebben we uitvoerig de verplaatsing van cellen bestudeerd. Echter, dit geeft een beeld van het "gedrag" van de cellen zelf, maar deze testen laten niet zien hoe de cellen reageren op een levend organisme, of omgekeerd hoe het organisme reageert op de cellen. Volgens veiligheidsvoorschriften is onderzoek in levende proefdieren vereist voordat we een volgende stap in de biologische kunstnier ontwikkeling kunnen maken. Hiervoor verwijzen wij naar het document "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report.

4.2 **Vermindering**

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

Volgens veiligheidsvoorschriften wordt een aantal dieren per behandelgroep aangegeven, namelijk 10 dieren, en wij zullen dit aantal aanhouden.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

We gebruiken speciale ratten die bij uitstek geschikt zijn voor kanker- en transplantatieonderzoek. Deze dieren hebben een sterk verminderde afweer waardoor zij vatbaarder zijn voor het ontwikkelen van kanker of tumoren.

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

Dieren worden dagelijks gecontroleerd op welzijn door gecertificeerd personeel. Alle handelingen worden zo kort en efficiënt mogelijk uitgevoerd en alleen door bevoegd en bekwaam personeel om het ongerief bij de dieren zo veel mogelijk te beperken.

Huisvesting zal zodanig plaatsvinden dat de kans op infecties wordt geminimaliseerd.

De dieren zullen vanwege de aard van het project zeer frequent bekeken en gewogen worden. Tevens zullen de dieren worden gedood indien ze specifieke klinische symptomen gerelateerd aan de tumorvorming vertonen.

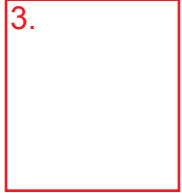
De eindpunten zullen aangehouden worden zoals deze vermeld staan in het "Code of practice: proefdieren in kankeronderzoek".

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

The number of patients with chronic kidney disease (CKD) and end stage renal disease (ESRD) is continuously growing. Currently, more than 2 million people are suffering from ESRD worldwide, and the number is still increasing [1]. The major problem in CKD patients, other than kidney function loss, is the

presence of several comorbidities, such as cardiovascular disease, that develop as a result of accumulation of uremic waste metabolites, thus increasing mortality in this patient population [2-4]. Currently available treatments for CKD and ESRD are hemodialysis, peritoneal dialysis and kidney transplantation, with transplantation being the preferred one due to its ability to restore kidney function. Because of the shortage in kidney donors, for most of the patients this treatment is not available, which makes (hemo- or peritoneal) dialysis the only available treatment. However, dialysis is not very efficient in removing the uremic wastes, maintaining most of the mortality-associated comorbidities [5]. For that reason, innovative therapies for CKD are being developed, and one of the most promising solutions is the bioartificial kidney (BAK) device, composed of proximal tubule epithelial cells (PTEC) cultured on hollow fiber membranes (HFM) with generation of confluent and fully differentiated epithelial cell monolayers [6]. Such a (extracorporeal) device will be able to improve the removal of uremic waste compounds from blood of affected patients, by incorporating the physiological functions of the renal tubules such as excretion (Figure 1).

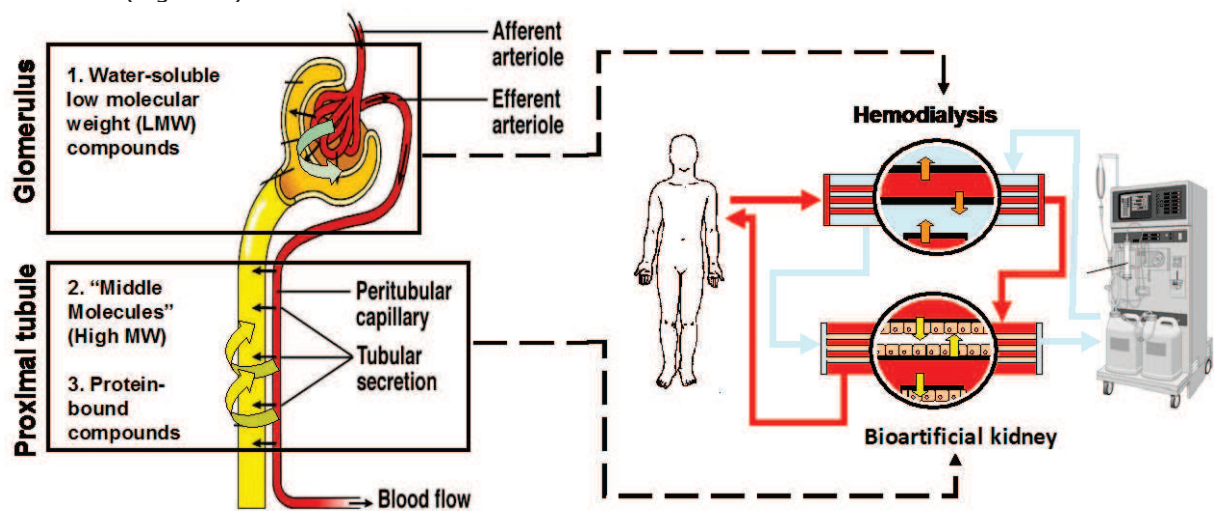


Figure 1. Combination of hemodialysis (mimicking glomerular function) and of the bioartificial kidney (BAK; mimicking tubular function) for achieving a complete removal of uremic solutes from blood.

For the purpose of BAK development we intend to use conditionally immortalized proximal tubule epithelial cell lines (ciPTEC), derived from urine of healthy donors [7, 8]. Although the use of patient's own kidney cells would be preferred, this is, as of yet, not possible. The ciPTEC were obtained through immortalization by retroviral transduction with temperature-sensitive mutant U19tsA58 of SV40 large T antigen (SV40T) and the essential catalytic subunit of human telomerase (hTERT), as described [9-11], which allows them to proliferate at the permissive temperature of 33°C and to differentiate to mature PTEC at non-permissive temperature of 37°C. In addition, a lentiviral transduction was performed in ciPTEC in order to overexpress the organic anion transporter 1 (OAT1;SLC22A6), involved in active tubular uptake of organic anions in humans [12], among which the protein-bound anionic uremic toxins [13]. ciPTEC were extensively characterized for many proximal tubule functions, such as transport activities, and were successfully cultured on HFM for BAK development [7, 12, 13]. Moreover, our recent data demonstrate that ciPTEC are not immunogenic and, therefore, represent a safe choice for BAK application because immunosuppressive agents may not be needed with its application.

However, given that the cell immortalization is one of the key steps during the process of transformation and tumorigenesis, there is an important concern regarding the safety aspects of using immortalized cells with retroviral delivery and ectopic expression of different oncogenes, such as SV40T, for cell therapy and tissue engineering applications. One of the major risks associated with the use of retro- and lentiviruses is the potential for tumorigenesis and oncogenesis, which can depend on the nature of the vector system, as well as the transgene itself. In the case of immortalization by SV40T there are two main mechanisms of action: 1) activation of E2F-mediated transcription and (2) inhibition of p53. The overall effect of this SV40T mechanism of action is excessive cellular proliferation by overcoming growth arrest and preventing apoptosis [14]. However, the fact that SV40T used for the immortalization of

ciPTEC is temperature-sensitive mutant can make it a safer option for cell therapy applications. In fact, our current studies *in vitro* show that the SV40T expression at 37°C is completely absent in ciPTEC, and the proliferation of cells cultured at non-permissive temperature is significantly reduced, which indicates that the expression of SV40T is highly controlled. In addition, the hTERT, also used for cell immortalization, is responsible for elongation of telomeres by adding TTAGGG sequences to the end of existing chromosomes, thus allowing cells to avoid senescence and continue to grow and divide, without inducing cell transformation [15].

Moreover, the genome integrational site analyses that we performed showed that the integration of the transgenes (SV40T, hTERT and OAT1), even though being random, is stable and not involving any genes responsible for cell growth and proliferation, further confirming that genetically modified ciPTEC do not show any, potentially dangerous, genomic alterations.

As stated by World Health Organization (WHO), *in vitro* systems are not always sufficient to prove the lack of tumorigenic effect of a cell line intended for cell therapy applications. Therefore, the capacity to form tumors needs to be tested in immunosuppressed animals. In addition, the oncogenic potential of cell substrates, such as DNA or cell lysate, or the oncogenic activity of viral agents that might be present in the cells, are other fundamental questions that have to be addressed using immunodeficient animal models [16].

1. Neiryneck, N., et al., *An update on uremic toxins*. Int Urol Nephrol, 2013. **45**(1): p. 139-50.
2. Ortiz, A., et al., *Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure*. Lancet, 2014. **383**(9931): p. 1831-43.
3. Vanholder, R., et al., *A bench to bedside view of uremic toxins*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(5): p. 863-70.
4. Go, A.S., et al., *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization*. N Engl J Med, 2004. **351**(13): p. 1296-305.
5. Deltombe, O., et al., *Exploring Protein Binding of Uremic Toxins in Patients with Different Stages of Chronic Kidney Disease and during Hemodialysis*. Toxins (Basel), 2015. **7**(10): p. 3933-46.
6. Jansen, J., et al., *Biotechnological challenges of bioartificial kidney engineering*. Biotechnol Adv, 2014. **32**(7): p. 1317-27.
7. Wilmer, M.J., et al., *Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(2): p. 449-57.
8. Jansen, J., et al., *A morphological and functional comparison of proximal tubule cell lines established from human urine and kidney tissue*. Exp Cell Res, 2014. **323**(1): p. 87-99.
9. O'Hare, M.J., et al., *Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 646-51.
10. Saleem, M.A., et al., *A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(3): p. 630-8.
11. Satchell, S.C., et al., *Conditionally immortalized human glomerular endothelial cells expressing fenestrations in response to VEGF*. Kidney Int, 2006. **69**(9): p. 1633-40.
12. Nieskens, T.T., et al., *A Human Renal Proximal Tubule Cell Line with Stable Organic Anion Transporter 1 and 3 Expression Predictive for Antiviral-Induced Toxicity*. AAPS J, 2016. **18**(2): p. 465-75.
13. Jansen, J., et al., *Bioengineered kidney tubules efficiently excrete uremic toxins*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26715.
14. Ahuja, D., M.T. Saenz-Robles, and J.M. Pipas, *SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation*. Oncogene, 2005. **24**(52): p. 7729-45.
15. Jiang, X.R., et al., *Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 111-4.
16. *WHO Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks*. Geneva, World Health Organization (WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-first report; WHO Technical Report Series, No. 978, Annex 3), 2010.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The main objective is to study the safety of ciPTEC OAT1 kidney cells in vivo. Hereby we investigate both the tumorigenicity and the oncogenicity of these specific kidney cells.

Tumorigenicity:

Tumorigenicity is defined as the property of cells to form tumors when inoculated into susceptible animals. As such, tumors that arise contain cells derived from the inoculated cells. This can occur at the site of injection but also elsewhere due to metastasis.

Oncogenicity:

Oncogenicity is defined as the property of an acellular agent to induce cells of an animal to become tumor cells. Tumors that arise are derived from the host itself. Oncogenic activity from cell substrates could be due to either the cell substrate DNA (and perhaps other cellular components) or an oncogenic viral agent present in the cells.

Procedure:

Tumorcells will be implanted in the flank, after which animals will be observed for developing tumors. In case of developing tumors, tumorsize will be measured using a digital or vernier caliper.

Translation:

As soon as any risk on tumorigenicity or oncogenicity results from the animal study, further development of the BAK system in its current form will be terminated. It is not known how humans respond to conditionally immortalized cell systems. Therefore, translation of negative results (i.e. no risk) to human is hampered. However, the choice of an immunodeficient animal model increases the reliability of such a translation.

Achievability:

We are convinced that our aim will be achieved within this project and we can decide whether or not ciPTEC-OAT1 kidney cells are tumorigenic/oncogenic.

The aim is achievable, since:

- Most importantly, we use a well established animal model in oncology, namely the T-cell deficient nude RNU rat. This is a susceptible rat in which cancerous cells are most likely to arise.
- We monitor the live animals for a long period of time after inoculation
- Tumors can easily be localized (by palpation) and measured (and be compared to our positive controls)
- Tissue can be examined both histologically and genotypically afterwards

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

There is a great need of a BAK. People with a serious health condition or disease in which their kidneys fail, currently depend on kidney transplantation or kidney dialysis as possible treatments. However, both treatments are far from ideal. Patients undergoing dialysis have a poor quality of life and a lot of patients awaiting transplantation cannot be helped in time due to donor shortage. Moreover, even after successful transplantation there is still a chance of rejection of the donor kidney, for which patients need to take immunosuppressive medication with many side effects.

Kidney dialysis is a treatment that will remove certain toxic waste products (20%) from the body. However, other toxic waste products (80%) unfortunately cannot be removed and will accumulate in the body over time. This is due to limitations of the currently applied filter membranes within the artificial kidney.

A possible solution for these problems is the BAK. This is an artificial kidney that contains allogeneic

human kidney cells, such as our ciPTEC-OAT1 derived from a healthy donor. Those cells will remove the remaining toxic waste products that cannot be removed by the regular dialysis process. Great progress is currently being made in this field of research with promising results. These ciPTEC OAT1 cells are genetically modified so that they can be cultured on a large scale. Because of this modification an increased risk for tumorigenic or oncogenic properties exists.

In this project, we will investigate the safety of those genetically modified human kidney cells after inoculation in a living organism. We will investigate whether these cells can directly form tumors or metastases, and we will investigate whether the content of these cells has cancer promoting properties in an indirect manner.

When proven safe, these cells can be used for further development of the BAK. And once the BAK has been validated and made operational it will help and save millions of lives all over the world.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

This project is a straightforward project with only one “type of animal procedure”, which contains a single experiment with four treatment groups. One positive control group, one negative control group, one tumorigenicity group and one oncogenicity group. Ten animals per treatment group will be inoculated and followed for a period of minimal 4 months and a maximum of 6 months. During this period we will measure tumorsize twice a week and perform clinical observation three times a week. At the end of the experiment, all animals will be euthanized and examined for gross and microscopic evidence of the growth of inoculated cells at the site of injection and in other sites. Also, all animals will be imaged at two timepoints for further evidence of growing cells in other sites.

Minimal observation period (4 months):

This minimal required observation period is stated in the WHO report: WHO Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Geneva, World Health Organization (WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-first report; WHO Technical Report Series, No. 978, Annex 3), 2010; p138.

Maximal observation period (6 months):

This maximal observation period was previously used in a study by Liu et al. 2010. We want to use the same observation period. **Liu J, Mani S, Schwartz R, Richman L, Tabor DE. Vaccine. 2010 Feb 3;28(5):1285-93. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.11.023.** Liu also studied the oncogenicity and tumorigenicity of kidney cells (the canine MDCK cell line). This study was done to ensure the safety of this cell line for vaccine production. For oncogenicity they injected MDCK cell lysate and cell DNA into immunodeficient rats. For tumorigenicity they injected an intact MDCK cell suspension into immunodeficient mice. A HeLa cell suspension was used as a positive control.

Image timepoints:

First timepoint will be the at which the animals of the positive controlgroup start developing nodules, the second timepoint is at the end of experiment (human endpoint or end of observational period).

HeLa cells (positive control group):

HeLa cells comprise an immortalized, continuously cultured cell line of human cancer cells. Unlike normal body (somatic) cells, HeLa cells thrive indefinitely in laboratory tissue cultures, a trait that has allowed them to assume tremendous importance in biomedical research. Since the mid-twentieth century, the cells have been distributed around the world and used in innumerable medical endeavors, including investigations into the nature of cancer, the development of vaccines, the mapping of genes, the treatment of diseases, and the mechanisms involved with programmed cell death (apoptosis). The cell line arose in 1951 from samples collected during a biopsy on Henrietta Lacks, a poor 31-year-old African-American patient suffering from a cervical tumor. The designation HeLa, derived from the first two letters of her first and last names, was used to keep her identity anonymous. (Henrietta Lacks, who died later in

1951, was not publicly identified as the source of the cells for another two decades.) During subsequent investigations, the sample cells were found to behave abnormally. Unlike typical somatic cells, which undergo cell aging (senescence) and lose the ability to divide and replicate after a few dozen generations (the so-called Hayflick limit), the cells from Henrietta Lacks never stop dividing. Being tumor cells, HeLa cells also do not die from apoptosis, the mechanism that normally causes abnormal or unneeded cells to self-destruct. HeLa cells thus became the first line of human cells to survive indefinitely in vitro (under proper culture-growing conditions). The hardiness of these cells was noted early in the medical literature, resulting in numerous requests by other laboratories and research institutions for samples that could be cultured. As such, HeLa cells were disseminated around the world and became the basis for numerous medical studies that have benefited humankind. For example, Jonas Salk used HeLa cells in the work leading up to his creation of a vaccine for polio. In addition, HeLa cells were the first human cells to be cloned.

When results are inconclusive, we want to repeat this procedure in a second batch of animals at a later timepoint. Also, WHO guidelines (reference [16]) state that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then the experiment should be repeated.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

Step1, Habituation:

1 week of habituation upon arrival of the animals to reduce stress levels

Step 2, Inoculation of the animals:

Positive control group: single injection of viable HeLa cells

Negative control group: single injection of vehicle

Tumorigenicity testgroup: single injection of viable ciPTEC-OAT1 cells

Oncogenicity test group: single injection of ciPTEC-OAT1 cell lysate

Step 3, Observation period and assessment of tumorigenicity and oncogenicity:

Animals will be observed three times per week. The animals will be weighed and their welfare will be carefully monitored. The body surface will be examined for tumors that may arise.

Assessment of the inoculation site over time:

If a nodule appears, it is measured in two perpendicular dimensions, the measurements being recorded two times per week to determine whether the nodule grows progressively, remains stable, or decreases in size over time. Moreover, at the time the first nodule appears, rats will be imaged to have more in-depth information on tumor formations and metastases.

Minimal observation period is 4 months (unless human endpoints are reached earlier), the maximal observation period is 6 months

Step 4; Final Assessment of the inoculation site and other sites:

At the end of the observation period, all animals, including the control groups, will be anesthetized and scanned using a whole body imager to screen for tumors and metastases. Next, animals will be euthanized and examined further for gross and microscopic evidence of tumour formation at relevant tissues.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

Validation of the procedure:

Progressively growing tumors should be produced in at least 9 of 10 animals injected with the positive control reference HeLa cells. At least 90% of the inoculated control cells must be positive for the test to be valid. Due to the nature of the HeLa cells, it is not expected that this percentage will be lower than 90% but if it does happen, we will repeat the experiment.

Assessment of the inoculation site over time:

If a nodule appears, it is measured in two perpendicular dimensions, the measurements being recorded weekly to determine whether the nodule grows progressively, remains stable, or decreases in size over time. Cell lines that produce nodules that fail to grow progressively are not considered to be tumorigenic.

Tumorigenicity:

Interpretation of results: The test is considered positive if at least 2 of 10 animals inoculated with the test article cells develop tumors at the site of inoculation or at a metastatic site or histologic or genotypic examination reveals that the nature of the cells constituting the tumors is consistent with that of the inoculated cells. If only one of 10 animals develops a tumor that meets the previous criteria, the cell line should be considered possibly tumourigenic and examined further.

Oncogenicity:

Interpretation of results: If tumours arise in the cell lysate or DNA assay, then these could be induced by an oncogenic virus or oncogenic DNA. The test is considered positive if at least 2 of 10 animals inoculated with the cell content develop tumors at the site of inoculation or at a metastatic site or histologic or genotypic examination reveals that the nature of the cells constituting the tumors is consistent with that of the inoculated the positive control reference cells. If only one of 10 animals develops a tumor that meets the previous criteria, the cell line should be considered possibly oncogenic and examined further.

Milestones:

minimal duration of the observational period: 4 months post-inoculation

maximal duration of the observational period: 6 months post-inoculation

early cessation of experiment: when human endpoint is observed as defined in the "Code of practice: proefdieren in kankeronderzoek"

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Tumorigenicity and oncogenicity in vivo
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10800
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Universiteit Utrecht
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | Tumorigenicity and oncogenicity in vivo |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

This project is a straightforward project with only one "type of animal procedure", which contains a single experiment with four treatment groups.

One positive controlgroup: This group is included to validate the test. Animals will receive viable HeLA cells which are known to induce tumors.

One negative controlgroup: This group will give us information about spontaneous tumor development in these animals under standard conditions. Animals will receive vehicle.

One tumorigenicity group: Tumors arising in this group are a direct outcome parameter for measuring tumorigenicity. Animals will receive viable kidney cells (ciPTEC-OAT1).

One oncogenicity group: Tumors or cancerous tissue arising in this group are a direct outcome parameter for measuring oncogenicity. Animals will receive a kidney cell lysate.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Step1, Habituation:

1 week of habituation upon arrival of the animals to reduce stress levels

Step 2, Inoculation of the animals:

Positive control group (n=10): single SC injection of 10^7 viable HeLa cells suspended in 0.1 ml PBS

Negative control group (n=10): single SC injection of 0.1 ml PBS

Tumorigenicity test group (n=10): single SC injection of 10^7 viable ciPTEC-OAT1 cells suspended in 0.1 ml PBS

Oncogenicity test group (n=10): single SC injection of cell lysate suspended in 0.05-0.1 ml

Injection site for all animals is the flank

Step 3, Observation period and assessment of tumorigenicity and oncogenicity:

Animals will be observed three times per week. The animals will be weighed and their welfare will be carefully monitored. The body surface will be examined for tumors that may arise.

Assessment of the inoculation site over time:

If a nodule appears, it is measured in two perpendicular dimensions, the measurements being recorded two times per week to determine whether the nodule grows progressively, remains stable, or decreases in size over time. Moreover, at the time the first nodule appears, rats will be imaged to have more in-depth information on tumor formations and metastases.

Minimal observation duration is 4 months, the maximal observation period is 6 months

Step 4; Final Assessment of the inoculation site and other sites:

At the end of the observation period, all animals, including the control groups, will be anesthetized and scanned using a whole body imager to screen for tumors and metastases. Next, animals will be euthanized and examined further for gross and microscopic evidence of tumour formation at relevant tissues. Any tumor that is identified is divided into three equal parts: a) fixed in formalin for histopathology; b) used to establish a cell line, when possible; and c) frozen for subsequent molecular analysis.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

As this project is a safety study, we refer to the "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137 in which the number of animals per treatment group is stated.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Species and origin:

For these studies, Hsd:RH-Foxn1^{tmu} rats from a registered breeding laboratory in the EU will be used (Envigo). This model is derived from animals obtained from the Rowett Research Institute, Aberdeen, Scotland. It is a T cell deficient rat model which is well established for oncology and transplantation research. We will use both males and females, preferably five per sex per group

Estimated numbers:

The "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137 states that 10 animal per group should be used for the determination of tumor formation capacity. Since we have 4 treatment groups, the number of animals will be 40. As this is considered a single experiment, a repetition of the experiment in a different batch of animals at a later timepoint is warranted. The report states that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then those groups should be repeated.

More precisely we refer to report page number 137, annex3, section B.8.5 "Number of test animals". Also, for tumorigenicity we refer to page 180, section 1, "number of test animals". For oncogenicity we refer to page 185, annex 3, section 4, "Number of test animals".

This brings the total amount of animals for this application to 80.

Life stage:

The rats will be 4 weeks old upon arrival. Younger animals are more susceptible regarding the development of tumors.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement:

A number of in vitro tests have already been done on ciPTEC-OAT1 kidney cells in the laboratory. Examples are SV40T expression, focus formation assay, anchorage independent growth assay, invasion assay, karyotyping and p53 and Rb activity. As all results were negative for potential risk, we aim to pursue our studies demonstrating safety in vivo.

Reduction:

Not applicable. We use the number of animals stated in the document "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137.

Refinements:

If possible, we will house the animals in IVC cages to minimise infections. Also, we will frequently observe each animal. As animal model we will use the RNU nude rat. This is a susceptible rat specifically designed for oncology studies. We will euthanize animals that reach their human endpoint.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

When animals develop severe adverse effects, we will euthanize them and examine the tissue. This way we will prevent adverse effect from maximising.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The ciPTEC OAT1 cells are developed in our research group and we have ample experience with these cells. The experiments proposed in this application have never been performed, not in our group nor in collaborating groups that use our cells. Cell use outside our group is restricted because of a patent.

Repetition is required by safety regulations. The report states that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then those groups should be repeated.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Discomfort caused by the localisation of the tumor, anxiety, inflammation, diarrhea, constipation, paralysis.

Explain why these effects may emerge.

The above mentioned adverse effects are general effects of developing cancer in a body.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

We will frequently observe for discomfort and apply the humane endpoints as defined in section J. Also, Paralysis and diarrhea are criteria for euthanasia.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

- Tumor mass: maximal acceptable tumormass 10%, \pm 40 cm³ or a 4,2 cm diameter.
- Weight loss: >15% of body weight in 2 days
- Severe clinical symptoms, Cachexia or when death is soon expected (moribund)

Indicate the likely incidence.

Positive control group: We expect at least 90% of the animals in this treatment group to develop severe symptoms.

Negative control group: We expect none of these animals to develop severe symptoms since the negative treatment group will receive a vehicle injection of PBS instead of cells or cell content.

Tumorigenicity testgroup: There is a chance that tumors or cancer will develop in this group. The likelihood is unknown and is exactly the aim of this project.

Oncogenicity test group: There is a chance that tumors or cancer will develop in this group. The likelihood is unknown and is exactly the aim of this project.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

This animal procedure "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo" will be assigned to the category 'moderate'. The adverse effects are mentioned in section I. These possible developing effects will depend on when, where and how the tumor develops.

Positive control group: moderate (25%)

Negative control group: light (25%)

Tumorigenicity testgroup: moderate (25%)

Oncogenicity test group: moderate (25%)

Summary: 25% light discomfort and 75% moderate discomfort

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

At the end of the observation period, all animals, including the reference group(s), are euthanized and examined for gross and microscopic evidence of tumor formation at the site of injection and in other sites. Any tumour that is identified is divided into three equal parts: a) fixed in formalin for histopathology; b) used to establish a cell line, when possible; and c) frozen for subsequent molecular analysis.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



5.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002017879

Bijlagen

2

Datum 22 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 februari 2017. Het gaat om uw project "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002017879. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

22 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017879

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
22 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017879

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Post-doc onderzoeker
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 april 2017
Geplande einddatum: 1 oktober 2018
Titel project: Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells
Titel niet-technische samenvatting: Kanker bevorderende en tumorvormende eigenschappen van genetisch aangepaste niercellen.
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Utrecht
Datum: 16 februari 2017

Datum:
22 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017879



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80011
3508 TA UTRECHT


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002017879
Bijlagen
2

Datum 22 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 22 februari 2017
Vervaldatum: 24 maart 2017
Factuurnummer: 170879
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002017879	€ 1035,-

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002017879

Datum 24 februari 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 22 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells" met aanvraagnummer AVD108002017879. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In de NTS wordt gesproken over ernstig ongerief. In de bijlage dierproeven wordt het ongerief geclassificeerd als matig. Pas de documenten aan en stuur deze opnieuw in.

Bij de 3V's wordt aangegeven dat er waar mogelijk dieren in een IVC unit worden gehuisvest. Hoe voorziet u in adequate huisvesting als de dieren niet in een IVC gehuisvest worden, dit in relatie tot het gegeven dat u immunodeficiente dieren gebruikt.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

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

Datum:

24 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017879

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | Tumorigenicity and oncogenicity in vivo |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

This project is a straightforward project with only one "type of animal procedure", which contains a single experiment with four treatment groups.

One positive controlgroup: This group is included to validate the test. Animals will receive viable HeLa cells which are known to induce tumors.

One negative controlgroup: This group will give us information about spontaneous tumor development in these animals under standard conditions. Animals will receive vehicle.

One tumorigenicity group: Tumors arising in this group are a direct outcome parameter for measuring tumorigenicity. Animals will receive viable kidney cells (ciPTEC-OAT1).

One oncogenicity group: Tumors or cancerous tissue arising in this group are a direct outcome parameter for measuring oncogenicity. Animals will receive a kidney cell lysate.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Step1, Habituation:

1 week of habituation upon arrival of the animals to reduce stress levels

Step 2, Inoculation of the animals:

Positive control group (n=10): single SC injection of 10^7 viable HeLa cells suspended in 0.1 ml PBS

Negative control group (n=10): single SC injection of 0.1 ml PBS

Tumorigenicity testgroup (n=10): single SC injection of 10^7 viable ciPTEC-OAT1 cells suspended in 0.1 ml PBS

Oncogenicity test group (n=10): single SC injection of cell lysate suspended in 0.05-0.1 ml

Injection site for all animals is the flank

Step 3, Observation period and assessment of tumorigenicity and oncogenicity:

Animals will be observed three times per week. The animals will be weighed and their welfare will be carefully monitored. The body surface will be examined for tumors that may arise.

Assessment of the inoculation site over time:

If a nodule appears, it is measured in two perpendicular dimensions, the measurements being recorded two times per week to determine whether the nodule grows progressively, remains stable, or decreases in size over time. Moreover, at the time the first nodule appears, rats will be imaged to have more in-depth information on tumor formations and metastases.

Minimal observation duration is 4 months, the maximal observation period is 6 months

Step 4; Final Assessment of the inoculation site and other sites:

At the end of the observation period, all animals, including the control groups, will be anesthetized and scanned using a whole body imager to screen for tumors and metastases. Next, animals will be euthanized and examined further for gross and microscopic evidence of tumour formation at relevant tissues. Any tumor that is identified is divided into three equal parts: a) fixed in formalin for histopathology; b) used to establish a cell line, when possible; and c) frozen for subsequent molecular analysis.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

As this project is a safety study, we refer to the "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137 in which the number of animals per treatment group is stated.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Species and origin:

For these studies, Hsd:RH-Foxn1^{tmu} rats from a registered breeding laboratory in the EU will be used (Envigo). This model is derived from animals obtained from the Rowett Research Institute, Aberdeen, Scotland. It is a T cell deficient rat model which is well established for oncology and transplantation research. We will use both males and females, preferably five per sex per group

Estimated numbers:

The "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137 states that 10 animal per group should be used for the determination of tumor formation capacity. Since we have 4 treatment groups, the number of animals will be 40. As this is considered a single experiment, a repetition of the experiment in a different batch of animals at a later timepoint is warranted. The report states that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then those groups should be repeated.

More precisely we refer to report page number 137, annex3, section B.8.5 "Number of test animals". Also, for tumorigenicity we refer to page 180, section 1,"number of test animals". For oncogenicity we refer to page 185, annex 3, section 4, "Number of test animals".

This brings the total amount of animals for this application to 80.

Life stage:

The rats will be 4 weeks old upon arrival. Younger animals are more susceptible regarding the development of tumors.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement:

A number of in vitro tests have already been done on ciPTEC-OAT1 kidney cells in the laboratory. Examples are SV40T expression, focus formation assay, anchorage independent growth assay, invasion assay, karyotyping and p53 and Rb activity. As all results were negative for potential risk, we aim to pursue our studies demonstrating safety in vivo.

Reduction:

Not applicable. We use the number of animals stated in the document "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137.

Refinements:

If possible, we will house the animals in IVC cages to minimise infections. Alternatively, we will use filtertop cages or housing in a specialised infection unit to minimise infections. Also, we will frequently observe each animal. As animal model we will use the RNU nude rat. This is a susceptible rat specifically designed for oncology studies. We will euthanize animals that reach their human endpoint.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

When animals develop severe adverse effects, we will euthanize them and examine the tissue. This way we will prevent adverse effect from maximising.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The ciPTEC OAT1 cells are developed in our research group and we have ample experience with these cells. The experiments proposed in this application have never been performed, not in our group nor in collaborating groups that use our cells. Cell use outside our group is restricted because of a patent.

Repetition is required by safety regulations. The report states that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then those groups should be repeated.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Discomfort caused by the localisation of the tumor, anxiety, inflammation, diarrhea, constipation, paralysis.

Explain why these effects may emerge.

The above mentioned adverse effects are general effects of developing cancer in a body.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

We will frequently observe for discomfort and apply the humane endpoints as defined in section J. Also, Paralysis and diarrhea are criteria for euthanasia.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

- Tumor mass: maximal acceptable tumormass 10%, \pm 40 cm³ or a 4,2 cm diameter.
- Weight loss: >15% of body weight in 2 days

- Severe clinical symptoms, Cachexia or when death is soon expected (moribund)

Indicate the likely incidence.

Positive control group: We expect at least 90% of the animals in this treatment group to develop severe symptoms.

Negative control group: We expect none of these animals to develop severe symptoms since the negative treatment group will receive a vehicle injection of PBS instead of cells or cell content.

Tumorigenicity testgroup: There is a chance that tumors or cancer will develop in this group. The likelihood is unknown and is exactly the aim of this project.

Oncogenicity test group: There is a chance that tumors or cancer will develop in this group. The likelihood is unknown and is exactly the aim of this project.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

This animal procedure "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo" will be assigned to the category 'moderate'. The adverse effects are mentioned in section I. These possible developing effects will depend on when, where and how the tumor develops.

Positive control group: moderate (25%)

Negative control group: mild (25%)

Tumorigenicity testgroup: moderate (25%)

Oncogenicity test group: moderate (25%)

Summary: 25% mild discomfort and 75% moderate discomfort

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

At the end of the observation period, all animals, including the reference group(s), are euthanized and examined for gross and microscopic evidence of tumor formation at the site of injection and in other sites. Any tumour that is identified is divided into three equal parts: a) fixed in formalin for histopathology; b) used to establish a cell line, when possible; and c) frozen for subsequent molecular analysis.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.II.859.028
2. Titel van het project : Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells
3. Titel van de NTS : Kanker bevorderende en tumorvormende eigenschappen van genetisch aangepaste niercellen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 10-01-2017
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 18-01-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 24-01-2017/03-02-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 13-02-2017

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 24-01-2017
- Datum antwoord: 03-02-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.2 Doel: De zin: "*Information on the use of conditionally ...limits the risk minimally*". In wat cryptisch geformuleerd. Onderzoeker vragen deze zin begrijpelijk te herschrijven.
Herschreven in 'It is not known how humans respond to conditionally immortalized cell systems. Therefore, translation of negative results (i.e. no risk) to human is hampered. However, the choice of an immunodeficient animal model increases the reliability of such a translation.'
- 3.4 Onderzoeksstrategie: U geeft hier aan dat dezelfde maximale observatieperiode wordt gebruikt als Liu in zijn onderzoek. De DEC zou graag kort wat meer informatie willen over wat Liu onderzocht heeft.
Toegevoegd: 'Liu also studied the oncogenicity and tumorigenicity of kidney cells (the canine MDCK cell line). This study was done to ensure the safety of this cell line for vaccine production. For oncogenicity they injected MDCK cell lysate and cell DNA into immunodeficient rats. For tumorigenicity they injected an intact MDCK cell suspension into immunodeficient mice. A HeLa cell suspension was used as a positive control.'

Bijlage 1

- B. De dieren: U geeft aan dat een N=10 nodig is voor het bepalen van de oncogeniciteit, maar dit is niet in overeenstemming met het WHO rapport waarnaar u refereert. Dit dient aangepast c.q. verhelderd te worden.
Toegevoegd: 'More precisely we refer to report page number 137, annex 3, section B.8.5 "Number of test animals". Also, for tumorigenicity we refer to page 180, section 1, "number of test animals". For oncogenicity we refer to page 185, annex 3, section 4, "Number of test animals".'
 - E. Herhaling: U zegt hier: "*Repitition is required by safety regulations*". Volgens de DEC klopt dit echter niet, dit is alleen nodig bij inconsistente resultaten (volgens het WHO rapport). Graag wijzigen.
De volgende uitleg is toegevoegd: 'The report states that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then those groups should be repeated.'
 - J. Humane eindpunten: Als humaan eindpunt noemt u >15% gewichtsverlies in 2 dagen of na het weekend. De DEC is echter van mening dat de dieren ook in het weekend gewogen dienen te worden. Graag wijzigen.
De tekst is aangepast in: '>15% gewichtsverlies in 2 dagen'
 - K. Classificatie van ongerief: U schat het ongerief in als ernstig. De DEC ziet echter geen enkele reden om het onderzoek tot ernstig ongerief te laten voortduren en is van mening dat met maximaal matig ongerief ook aangetoond moet kunnen worden of, wanneer, waar en hoe er celgroei is. Graag uw visie.
We zijn het eens met de mening van de DEC en hebben ongerief aangepast.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Mensen met een ernstige ziekte waarbij de nier faalt, zijn op dit moment afhankelijk van twee behandelmethoden: 1) een niertransplantatie of 2) nierdialyse. Een niertransplantatie is de beste behandeling, maar de gemiddelde wachttijd voor een nier ligt momenteel op 3 jaar. Hierdoor kunnen sommige patiënten niet op tijd worden geholpen. De patiënten die wel een transplantatie ondergaan moeten vervolgens hun leven lang medicijnen slikken om afstoting van de donor te voorkomen, wat veel bijwerkingen met zich meebrengt. Het grootste deel van de patiënten ondergaat nierdialyse, een behandelmethode dat ongeveer 20% van de schadelijke stoffen uit het lichaam kan halen. Dat betekent dat 80% van deze schadelijke stoffen in het lichaam achterblijft en zich ophopen. Hierdoor ontstaan heftige bijwerkingen, zoals vermoeidheid en een groot risico op hart- en vaatziekten. Als alternatieve behandeling wordt de biologische kunstnier ontwikkeld. Deze kunstnier, die buiten het lichaam wordt aangesloten op de bloedbaan, is van binnen bekleed met menselijke (ciPTEC OAT1) niercellen, die ervoor zorgen dat het overgrote deel van de schadelijke stoffen in het lichaam verwijderd kunnen worden. De niercellen zijn genetisch aangepast zodat ze in het laboratorium op grote schaal gekweekt kunnen worden waarna ze in de kunstnier gebracht worden. Bij deze vorm van behandeling wordt geen afweerreactie verwacht. Er moet echter nog onderzocht worden of de niercellen veilig zijn wanneer zij in een levend organisme terechtkomen. Onderzocht zal worden of de niercellen tumoren kunnen vormen en of de inhoud van deze cellen op een indirecte manier kankerbevorderende eigenschappen heeft. Om die reden is deze studie aan te merken als een veiligheidsstudie, met een straight forward opzet. De relatie tussen het hoofdoel en het subdoel is helder en vergelijkbaar met voorbeeld 4B uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project'.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is de veiligheid van ciPTEC OAT1 niercellen in vivo bestuderen, door de tumorigeniciteit en de oncogeniciteit te bepalen. Het uiteindelijke doel van het project is de humane toepassing van de biologische kunstnier. Om de stap naar humane toepassing van de biologische kunstnier te kunnen maken, is het wettelijk verplicht eerst een veiligheidsstudie te verrichten. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de doelgroep (nierdialyse patiënten) en het onderzoeksveld. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (gezondheid en stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de doelgroep worden bevorderd zijn: welzijn (kwaliteit van leven) en rechtvaardigheid (beschikbaarheid van een veilige therapie). De morele waarden die voor het onderzoeksveld bevorderd worden zijn: welzijn (wetenschappelijke ontwikkelingen).
6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC Utrecht is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Om de tumorigeniciteit te bepalen worden ciPTEC-OAT1 cellen in de flank geïnjecteerd en voor het bepalen van de oncogeniciteit worden gelyseerde cellen, eveneens in de flank, geïnjecteerd. Vervolgens worden de dieren gedurende een periode van minimaal 4 en maximaal 6 maanden 3x per week geobserveerd en vanaf het moment dat zich tumoren ontwikkelen wordt de tumorgroei en metastasering 2x per week gemeten om te bepalen of de tumor groeit, stabiel blijft of afneemt. Aan het einde van de observatieperiode worden de dieren onder anesthesie geïmaged om alle tumoren in kaart te brengen. Hierna worden de dieren gedood om bloed en relevante weefsels nader te onderzoeken op de aanwezigheid van tumoren of kankercellen. De DEC is derhalve van mening dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor 25% van de dieren is het ongerief ingeschat op licht vanwege een subcutane injectie met een zoutoplossing. De overige 75 % van de dieren zal maximaal matig ongerief ervaren vanwege de subcutane injectie en de mogelijke ontwikkeling van tumoren.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door het toedienen de subcutane injectie, waardoor al dan niet tumoren zullen gaan groeien.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd. Het is echter lastig in te schatten welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt bereikt. De onderzoeker verwacht dat 90% van de dieren in de positieve controle groep het humane eindpunt bereikt. Van de negatieve controle groep wordt verwacht dat geen van de dieren het humane eindpunt bereikt omdat zij enkel een zoutoplossing krijgen toegediend. Van de tumorigeniciteit en oncogeniciteit groep is nog niet aan te geven of zich tumoren zullen ontwikkelen; het is juist het doel van dit onderzoek om dat uit te zoeken.
- 3V's
14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Er hebben reeds *in vitro* experimenten plaatsgevonden, waarbij de resultaten negatief waren. Volgens veiligheidsvoorschriften dient dit ook *in vivo* bevestigd te worden alvorens de translatiestap gemaakt kan worden.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Omdat dit project een veiligheidsstudie betreft, is

het aantal dieren per behandelgroep gebaseerd op de "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Voor het project worden RNU naakte ratten gebruikt, welke zeer geschikt zijn voor oncologiestudies doordat zij een verminderde afweer hebben en daardoor vatbaarder zijn voor het ontwikkelen van tumoren, waardoor de gevoeligheid van de veiligheidstest toeneemt. Vanwege de verminderde afweer zijn de dieren ook vatbaarder voor het krijgen van infecties. Om die reden zullen de dieren, indien mogelijk, gehuisvest worden in IVC kooien. De dieren worden daarnaast regelmatig geobserveerd om ongerief tijdig te kunnen vaststellen en onnodig lijden te voorkomen.
17. De niercellen die in dit onderzoek worden getest op veiligheid zijn ontwikkeld door de aanvrager. Hiermee is aannemelijk gemaakt dat er geen duplicatie plaatsvindt en de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstellingen van het project alleen behaald kunnen worden door de dieren te onderzoeken op de aanwezigheid van tumoren of kankercellen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel ratten worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, gericht op het in vivo bestuderen van de veiligheid van menselijke ciPTEC OAT1 niercellen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2. Er vindt een beperkte tot aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met licht ongerief voor een kwart van de dieren en maximaal matig voor de dieren die mogelijk tumoren ontwikkelen. Daar staat tegenover dat dit onderzoek belangrijke informatie geeft over de veiligheid van de ciPTEC OAT1 niercellen in vivo en dat deze informatie op korte termijn van essentieel belang is voor vervolgonderzoek. Uiteindelijk kunnen de resultaten van het voorliggende onderzoek en eventuele vervolgonderzoeken ertoe bijdragen dat een finale stap kan worden gemaakt, namelijk translatie van de biologische kunstnier naar de mens. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Mensen met ernstige nierfalen, zijn op dit moment afhankelijk van twee suboptimale behandelmethoden, namelijk niertransplantatie of nierdialyse. Er is derhalve grote vraag naar een nieuwe behandelmethode. Indien deze veiligheidsstudie laat zien dat de ciPTEC OAT1 niercellen in vivo geen tumoren vormen en ook de inhoud van deze cellen op een indirecte manier geen kankerbevorderende eigenschappen hebben, dan zal dit project er toe bijdragen dat patiënten betere behandel mogelijkheden krijgen. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat het voor het onderzoeksveld van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het verrichten van deze veiligheidsstudie een essentieel belang vertegenwoordigt en dat dit essentiële belang opweegt tegen de beperkte tot aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002017879
Bijlagen
1

Datum 20 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 22 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells" met aanvraagnummer AVD108002017879. 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 "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 april 2017 tot en met 1 oktober 2018.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 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.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

Datum:

20 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017879

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

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

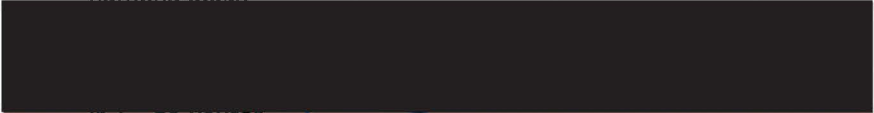
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



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: Universiteit Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 april 2017 tot en met 1 oktober 2018, voor het project "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells" met aanvraagnummer AVD108002017879, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 februari 2017, ontvangen op 20 februari 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1: Tumorigenicity and oncogenicity in vivo				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Hsd:RH-Foxn1 ^{rn} rats	80	75% Matig 25% Licht	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt 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:
AVD108002017879

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:

AVD108002017879

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:
AVD108002017879

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

Einde van een dierproef

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

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.