

Inventaris Wob-verzoek W17-12										
nr.	document NTS 2017887	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x		
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x		
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x		
7	Tabel				x		x	x		
8	DEC-advies				x		x	x		
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
10	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
11	Reactie DEC op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
12	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
13	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
14	Adviesnota CCD		x							x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x		

887

27 JUNI 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 10600 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Universiteit Leiden</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>27 36 89 29</td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Rapenburg 70</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9502</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>2300 RA Leiden</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL78RABO0102468869</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Universiteit Leiden / [REDACTED]</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Leiden	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	27 36 89 29	Straat en huisnummer	Rapenburg 70	Postbus	9502	Postcode en plaats	2300 RA Leiden	IBAN	NL78RABO0102468869	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Leiden / [REDACTED]
Naam instelling of organisatie	Universiteit Leiden																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	27 36 89 29																	
Straat en huisnummer	Rapenburg 70																	
Postbus	9502																	
Postcode en plaats	2300 RA Leiden																	
IBAN	NL78RABO0102468869																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Leiden / [REDACTED]																	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Postbus</td> <td>9502</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>2300 RA Leiden</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL78RABO0102468869</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Universiteit Leiden / [REDACTED]</td> </tr> </table>	Postbus	9502	Postcode en plaats	2300 RA Leiden	IBAN	NL78RABO0102468869	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Leiden / [REDACTED]								
Postbus	9502																	
Postcode en plaats	2300 RA Leiden																	
IBAN	NL78RABO0102468869																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Leiden / [REDACTED]																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie	[REDACTED]																	
Afdeling	[REDACTED]																	
Telefoonnummer	[REDACTED]																	
E-mailadres	[REDACTED]																	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																
Functie	[REDACTED]																	
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 | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het Ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 9 - 2017
- Einddatum 31 - 8 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Leiden
- Postadres [REDACTED] LUMC
Postbus 9600
2300 RC Leiden
- E-mailadres [REDACTED]

4 Betaalgegevens

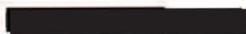
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541,- Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Naam 

Functie Gemandateerd vergunninghouder

Plaats Leiden

Datum - - 01-6-2017

Handtekening 



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

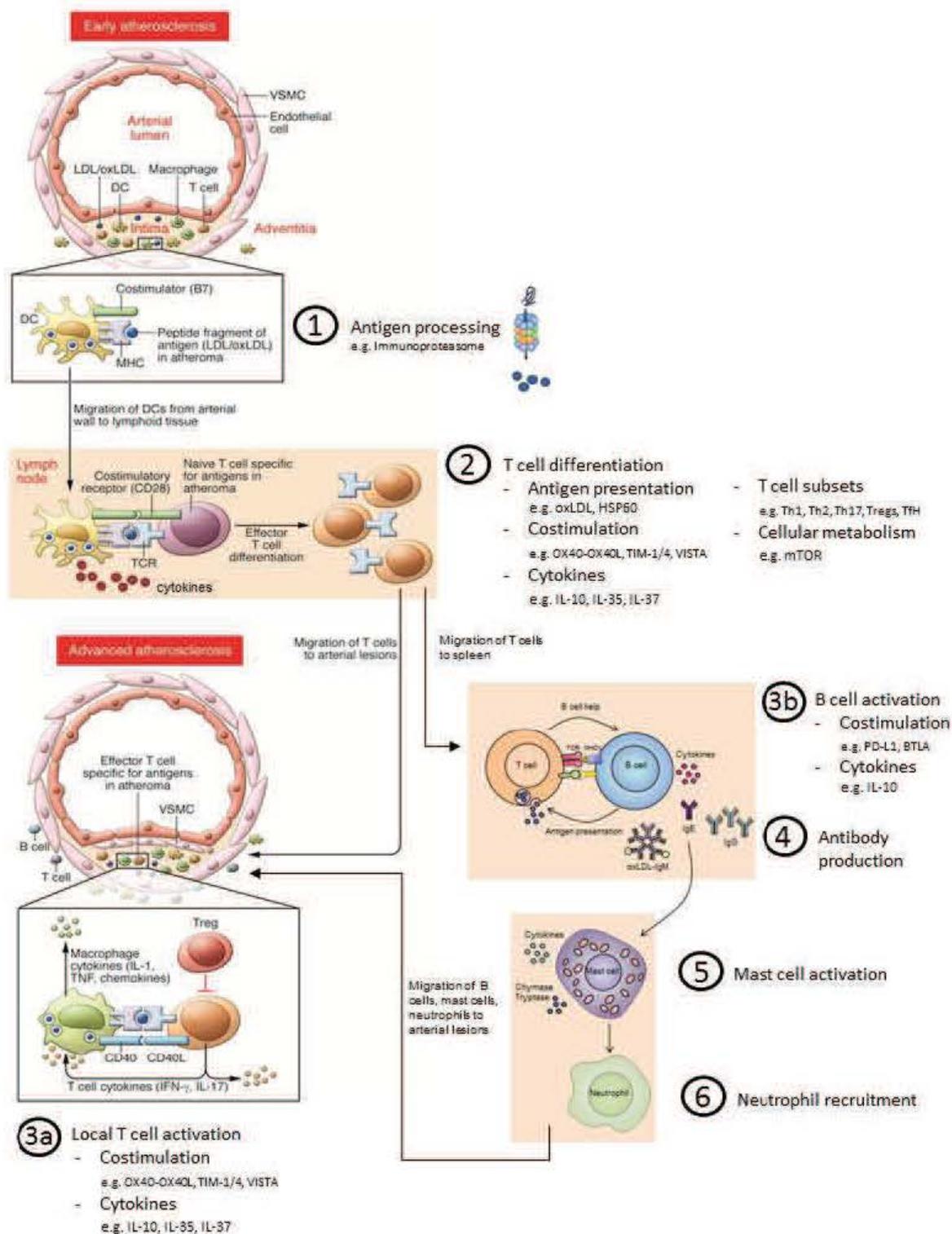
- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of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

Hart- en vaatziekten zijn nog steeds een van de belangrijkste doodsoorzaken in de Westerse wereld en Nederland alleen al telt ruim 1 miljoen hart- en vaatpatiënten (www.hartstichting.nl/hartvaten/cijfers). Het proces van vernauwing van de slagaders, aderverkalking of atherosclerose, is de belangrijkste oorzaak voor het ontstaan van deze hart- en vaatziekten. Acute cardiovasculaire syndromen, zoals hartinfarcten of beroertes, kunnen optreden als een dergelijke plaque scheurt, waardoor een stolsel gevormd wordt dat de slagader afsluit. Atherosclerose is enerzijds het gevolg van een ontsporing van het cholesterol metabolisme, wat leidt tot ophoping van cholesterol in de vaatwand en anderzijds het gevolg van een ontstekingsreactie, die optreedt door de verhoogde cholesterolniveaus. Het behandelen van hart- en vaatziekten met behulp van cholesterol verlagende geneesmiddelen zoals statines is een succesvolle behandelingsmethode voor atherosclerose en statines verminderen het risico op het krijgen van cardiovasculaire complicaties met ongeveer 30%. Dit betekent echter dat een zeer groot gedeelte van de hart- en vaatziekten patiënten geen baat hebben bij de huidige therapieën, en dat er een dringende noodzaak is om nieuwe therapeutische strategieën ontwikkelen. Het aantal patiënten dat overlijdt aan hart- en vaatziekten zou verder verlaagd kunnen worden door naast het verhoogde cholesterolniveau ook de chronische ontsteking, gedreven door het immuunsysteem, in de plaques te remmen en daarmee de ontwikkeling van atherosclerose tegen te gaan.

In de eerste fase van atherosclerose migreren monocyten vanuit het bloed naar de vaatwand waar het cholesterol vervoerende deeltje Lage Dichtheids Lipoproteïne (LDL) zich ophoopt en wordt geoxideerd tot oxLDL. Vervolgens differentiëren monocyten naar macrofagen en foamcellen. Deze foamcellen produceren cytokines die er voor zorgen dat vele andere immuuncellen zoals dendritische cellen naar de atherosclerotische plaque migreren. De activatie van het adaptieve immuun systeem is essentieel voor de ontwikkeling van atherosclerose en kan worden opgesplitst in de volgende processen die allemaal nauw met elkaar verbonden zijn (zie **Figuur 1**):

- (1) Antigen processing: antigenen aanwezig in de plaque worden opgenomen door antigen presenterende cellen zoals dendritische cellen. De antigen presenterende cellen migreren van de vaatwand naar de dichtstbijzijnde drainerende lymfeknoop alwaar ze een interactie aangaan met naïeve T cellen.
- (2) T cel differentiatie: activatie en expansie van naïeve T cellen is afhankelijk van drie signalen. Ten eerste is er een antigen specifiek signaal nodig dat wordt geleverd als de T cel receptor van de T cel een antigen kan herkennen dat op MHC-I of op MHC-II van de antigen presenterende cel wordt gepresenteerd. Ten tweede moet de antigen presenterende cel een activatie signaal afgeven door middel van costimulatorische routes, en ten derde moet er een cytokine signaal afgegeven worden dat de differentiatie van de T cel bepaalt.

Het immuunsysteem in atherosclerose



(3) De effector T cellen kunnen vervolgens twee richtingen op:

(3A): effector T cellen kunnen naar de plaque migreren alwaar ze weer geactiveerd kunnen worden door antigen presenterende cellen middels costimulatoire moleculen en cytokines. Ze dragen bij aan de lokale ontsteking en zorgen zo voor een chronische ontstekingsreactie.

- (3B): effector T cellen kunnen naar de milt migreren waar ze B cellen kunnen activeren. Verschillende B cell subtypes kunnen het immuunsysteem beïnvloeden middels cytokine productie en cel-cel interactie via costimulatoire moleculen. Antilichaam productie: rijpe (mature) B cellen kunnen differentiëren tot plasmacellen die IgG, IgM en IgE produceren. Mestcel activatie: de mestcel laat granules los die allerlei pro-inflammatoire mediators bevatten zoals cytokines en chymase/tryptase. Verhoogde activiteit van mestcellen is gecorreleerd met versnelde vaatvernauwing en destabilisatie van de atherosclerotische plaque.
- (4) Neutrofiel activatie: de pro-inflammatoire mediators die mestcellen uitscheiden leiden tot de activatie van neutrofielen die vervolgens weer bijdragen aan de progressie van atherosclerose.

De immunoreactie die dus ten grondslag ligt aan atherosclerose heeft vele aspecten en de processen dragen gezamenlijk bij aan de ontwikkeling en progressie van atherosclerose. Indien we één van de afzonderlijke processen in de immunoreactie remmen kan dit dus leiden tot het ontregelen van het gehele immuun proces en daardoor het proces van atherosclerose gunstig beïnvloeden. Regulatie van het immuunsysteem middels een immunologische interventie vormt daarom een veelbelovende therapie om hart- en vaatziekten te voorkomen. Binnen de huidige proefopzet wordt daarom gekeken naar verschillende manieren om de ontstekingsreactie tijdens atherosclerose te verminderen door pro-inflammatoire processen te remmen en door anti-inflammatoire cellen en processen te stimuleren.

Ingrijpen in deze processen, geeft niet alleen nieuwe fundamentele informatie over de bijdrage van de immunoreactie aan de ontwikkeling van atherosclerose, maar kan ook direct nieuwe therapieën opleveren, die het aantal hart- en vaatpatiënten kan verminderen.

Omdat bovengenoemde processen zeer sterk met elkaar samenhangen, is het van belang dat interventies op elk niveau onderzocht worden: van activatie van de verschillende immuuncellen tot de mate van atherosclerose, maar ook effecten op de lipidenhuishouding zullen worden onderzocht. Door de diversiteit in cardiovasculaire patiëntengroepen is het noodzakelijk om op verschillende niveaus in te kunnen grijpen, zodat er uiteindelijk per groep patiënten een passende behandeling kan worden toegepast. Er is dan ook meer kennis nodig op het gebied van specifieke immunologische aangrijpingspunten en over mogelijke combinatietherapieën, die op dit moment nog niet onderzocht zijn.

██████████ wordt gewerkt aan het ontrafelen van de mechanismen, die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van atherosclerose, en er wordt met name gewerkt aan de rol van het immuunsysteem in dit proces. Ons onderzoek richt zich op een aantal mogelijke strategieën om in te grijpen in het ontwikkelingsproces van atherosclerose. Zo kunnen we verschillende componenten van het immuunsysteem uitschakelen of remmen (zie figuur). We hebben bijvoorbeeld laten zien dat activatie van de mestcel de plaque kan destabiliseren, en dat het remmen van deze cel dit voorkomt⁶. Aan de andere kant kunnen we het immuunsysteem zodanig moduleren, dat de specifieke ontsteking in de atherosclerotische plaque wordt geremd. Zo hebben ██████████ plaquevorming kan remmen⁷, en dat het induceren van de ontstekingsremmende regulatoire T cellen (Tregs) beschermt tegen de ontwikkeling en progressie van atherosclerose⁸. Recentelijk hebben we ook aangetoond dat cellulaire therapie veel therapeutische potentie heeft. Het toedienen van ██████████ ██████████ kan zorgen voor een remming van atherosclerose¹⁰.

Ons experimentele onderzoek richt zich op translatie naar de patiënt. Zo is er bijvoorbeeld in samenwerking met het ██████████ van de mestcel in humane plaques, en het aantal mestcellen bleek een sterke voorspellende waarde te hebben voor het krijgen van een ██████████ ██████████. Er wordt daarnaast op dit moment binnen een EU-consortium gewerkt aan een vaccinatiestrategie, die recent (april 2016) heeft geleid tot een eerste klinische trial waarin patiënten worden gevaccineerd met als doel beschermende antilichamen tegen het cholesterol vervoerende LDL deeltje op te wekken. Deze trial wordt uitgevoerd door het Center for Human Drug Research (CHDR) en er wordt nu met specifieke muismodellen gewerkt aan een vervolgstudie (start

eind 2017). Dit onderschrijft het sterk translationele karakter van het onderzoek binnen onze afdeling.

De speerpunten van ons onderzoek zijn:

- Het identificeren van specifieke ontstekingsgenen en ontstekingseiwitten in het proces van atherosclerose (middels fundamenteel onderzoek), die gebruikt kunnen worden als target voor de ontwikkeling van geneesmiddelen.
- Therapieën ontwikkelen om plaques te stabiliseren en om plaque regressie te realiseren door de bovenstaande geneesmiddel targets te remmen/stimuleren.
- Het ontwikkelen van een therapeutisch vaccin tegen atherosclerose gebaseerd op fundamenteel onderzoek naar de rol van het immuunsysteem in het proces van atherosclerose.

Om het uiteindelijke doel van humane therapie te realiseren vormt proefdieronderzoek een noodzakelijke stap en willen we verschillende behandelingsstrategieën combineren om een maximale verbetering in de uitkomst van atherosclerose te realiseren. Deze vergunningaanvraag is dan ook modulair opgebouwd om combinaties van therapieën in adequate diermodellen voor hart- en vaatziekten te onderzoeken.

Referenties:

1) Libby P et al. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res.* 2015;116:307-311.

2) Tsiantoulas D et al. Targeting B cells in atherosclerosis: closing the gap from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:296-302.

4) Ridker PM et al. Interleukin-1 β inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am Heart J.* 2011;162:597-605.

5) Everett BM et al. Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial: a test of the inflammatory hypothesis of atherothrombosis. *Am Heart J.* 2013;166:199-207.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Ons hoofddoel is nieuwe immuuntherapieën te ontwikkelen, die de vorming van atherosclerotische plaques tegengaat en mogelijk de bestaande plaques stabiliseren of zelfs verkleinen (plaque regressie). Deze vergunningaanvraag richt zich in eerste instantie op drie therapievormen, die van belang zijn voor

de verdere ontwikkeling van een immuuntherapie voor de behandeling van atherosclerose. Dankzij nieuwe, fundamentele inzichten in de rol van het immuunsysteem bij de ontwikkeling van atherosclerose, verkregen uit deze experimenten en uit de literatuur, zullen wij in staat zijn om deze therapievormen verder te ontwikkelen richting een "first-in-humans" klinische trial. Dit onderzoek is ingekaderd in de langlopende onderzoekslijn van de vakgroep [REDACTED]

De drie centrale vormen van de ontwikkeling van een experimentele (combinatie)therapie voor atherosclerose, die de komende vijf jaar centraal staan, zijn hieronder uitgewerkt.

1. Immunotherapie tegen atherosclerose:

De ontwikkeling van atherosclerose is het gevolg van een ontspoorde immuunreactie in de vaatwand. Remming van de excessieve reactie van het immuunsysteem kan een beschermende werking hebben op de vorming van een atherosclerotische plaque. Het primaire doel van deze experimenten is daarom om de functie van immuun-modulerende stoffen, zoals antilichamen, "small molecules", siRNAs en cytokines, in de initiatie, progressie en regressie van atherosclerose te bepalen. Wij willen bestuderen of deze stoffen de basis kunnen vormen voor de verdere ontwikkeling van een therapie die het immuunsysteem gunstig beïnvloedt ter behandeling van hart- en vaatziekten.

2. Ontwikkelen van vaccins tegen atherosclerose:

Door middel van vaccinatiestrategieën kan het immuunsysteem op een specifieke manier worden gemoduleerd, waardoor de vorming van een atherosclerotische plaque geremd wordt of de plaque zelfs afgebroken wordt. Deze therapeutische vaccins behelzen het testen van de effectiviteit van vaccins tegen atherosclerose en hebben als primaire doel om de reactie van de T cel tegen eiwitten die betrokken zijn bij atherosclerose te moduleren. Mogelijke, werkzame onderdelen van een vaccin zijn gedeeltes van het apoB100 eiwit in het lage-dichtheids lipoproteïne (LDL), heat shock eiwitten (HSP60) en pro-inflammatoire cytokines. Het ontwikkelen van een vaccin tegen atherosclerose kan een langdurige bescherming opleveren voor een hart- en vaatziekten patiënt.

3. Ontwikkelen van cellulaire therapie:

Therapie met (stam)cellen is een therapeutische strategie die steeds meer aandacht krijgt, aangezien veelal met lichaamseigen cellen een behandeling van ziektes kan worden gestart. Deze experimenten hebben als doel om cellulaire therapieën te testen op hun effectiviteit om het ontstaan van atherosclerotische plaques het verminderen of al aanwezige atherosclerotische plaques te verkleinen (regressie). De verkregen resultaten kunnen leiden tot mogelijke cellulaire therapieën ter voorkoming of genezing van atherosclerose.

Haalbaarheid:

Wij achten de doelstellingen zoals hierboven beschreven als haalbaar. Deze doelstellingen zijn gebaseerd op ons huidige onderzoek, en met de ervaren personen en de middelen aanwezig in onze onderzoeksgroep zullen we in staat zijn de gestelde doelen te behalen en immuuntherapie voor atherosclerose verder te ontwikkelen. De proefdiermodellen die wij daarvoor zullen gebruiken zijn reeds opgezet. In onze onderzoeksgroep zullen we daarom ook in staat zijn om het juiste onderzoeksmodel te kiezen bij de specifieke onderzoeksvraag. De financiële ondersteuning van dit onderzoek komt uit fondsen voor wetenschappelijk onderzoek, zoals van de Hartstichting, NWO en van EU. Onze projectaanvragen zijn door internationale reviewers op kwaliteit en relevantie zeer positief beoordeeld en daarbij ook op haalbaarheid gescoord. Voor de komende vijf jaar hebben wij voldoende middelen ter beschikking om de voorgestelde onderzoeksprojecten uit te voeren.

Wij publiceren ons onderzoek de afgelopen jaren in wetenschappelijke internationale tijdschriften, waaronder *Circulation*, *Circulation Research*, *ATVB*, *Atherosclerosis*, *Annals of Surgery*, *Cardiovascular Research*, *Journal of Internal Medicine* en *Journal of Immunology*.

Ook is het dit jaar haalbaar gebleken om vele jaren preklinisch onderzoek te vertalen naar een klinische trial, waarin we onderzoeken of een vaccinatie tegen een lipide, zoals aanwezig in geoxideerd LDL, in

staat is om antilichamen die beschermen tegen atherosclerose zoals anti-PC-IgM te induceren (CHDR april 2016-mei 2017).

3.3 Belang

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

Medisch belang:

Hart- en vaatziekten vormen de belangrijkste doodsoorzaak in Westerse landen en ook Nederland telt ruim 1 miljoen hart- en vaatpatiënten (www.hartstichting.nl/hartvaten/cijfers). In de loop der jaren is door een verbeterde behandeling van de acute gevolgen van hart- en vaatziekten (infarcten) het aantal acute sterfgevallen ten gevolge van hart- en vaatziekten sterk gedaald. Toch ondervinden nog steeds veel mensen grote nadelige gevolgen van hart- en vaatziekten, zoals pijn op de borst (angina pectoris), problemen met het lopen (etalagebenen) en tijdelijk verminderde doorbloeding van de hersenen (TIA's). Deze uitingen van hart- en vaatziekten zijn voor ruim 70% het gevolg van atherosclerose en worden standaard behandeld met cholesterolsynthese remmers (statines), die leiden tot een daling van het plasma cholesterol niveau. Deze behandeling heeft echter een beperkt klinisch effect en kan het risico op cardiovasculaire complicaties met slechts 30% verminderen. Daarnaast wordt het succes van preventieve verwijdering van de plaque (dotteren, atherectomie) of van het aangedane bloedvatsegment in de praktijk verkleind door de geringe voorspelbaarheid van het tijdstip van een trombotische complicatie. De algemene opinie is dat ook de chronische ontsteking gedurende atherosclerose, die de ziekte mede veroorzaakt, moet worden aangepakt om tot genezing van atherosclerose te komen. Door de chronische ontsteking te bestuderen in muismodellen voor atherosclerose, en essentiële componenten en mechanismen van het immuunsysteem te identificeren, die leiden tot een vermindering van de ontsteking, kunnen naar nieuwe targets voor behandelingen gezocht worden. Door naar de initiatie, progressie en regressie van atherosclerose te kijken kunnen respectievelijk preventieve en behandelingsmethoden gevonden worden.

Maatschappelijk belang:

Hart- en vaatziekten vormen in Nederland een belangrijk medisch en dus maatschappelijk probleem. Naast de klachten bij de patiënt, leiden hart- en vaatziekten tot hoge kosten in de gezondheidszorg door medicijngebruik en operatief ingrijpen, maar ook door ziekteverzuim en arbeidsongeschiktheid. De hoge incidentie van hart- en vaatziekten betekent daarom een zware belasting voor de gezondheidszorg, de patiënt en de maatschappij (beperking in arbeidsinzet). Gegeven de grote impact die hart- en vaatziekten hebben dus hebben op de maatschappij, is de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen voor deze patiënten van zeer groot belang. De hier beschreven experimenten zouden mogelijk kunnen leiden tot alternatieve therapieën en kunnen een aanzienlijke reductie mogelijk maken van de bovengenoemde niet-medische en paramedische uitgaven aan hart- en vaatziekten.

Wetenschappelijk belang:

Gezien de hoge incidentie van het hart- en herseninfarct in de Westerse wereld, de grote klinische impact van een infarct en de nog beperkte inzichten in de processen verantwoordelijk voor het ontstaan en het scheuren van de plaque, is het te begrijpen dat wetenschappelijk onderzoek naar het ontstaan van atherosclerose en daaropvolgende plaqueruptuur hoge prioriteit bezit. Het verkrijgen van nieuwe fundamentele inzichten in de rol het immuunsysteem bij de ontwikkeling van atherosclerose, en de destabilisatie van een atherosclerotische plaque, maakt het mogelijk om nieuwe aangrijpingspunten te ontdekken, die van therapeutisch belang kunnen zijn, wat uiteindelijk ook maatschappelijk zeer relevant is. De resultaten verkregen uit ons onderzoek zullen gepubliceerd worden in peer-reviewed wetenschappelijke tijdschriften, zodat de opgedane kennis en inzichten openbaar gemaakt worden.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Deze aanvraag focust zich op het ontwikkelen van een immuuntherapie, waarbij er drie therapeutische mogelijkheden zullen worden onderzocht; (1) ingrijpen in de immuunrespons (immunomodulatie) ter

behandeling van atherosclerose, (2) ontwikkelen van vaccins tegen atherosclerose, (3) ontwikkelen van een cellulaire therapie. Waar nodig zullen wij deze drie centrale therapievormen willen combineren, omdat suppressie van het immuunsysteem een therapie kan vereisen die de interactie tussen immuuncellen via meerdere signalen, zoals antigen presentatie, cytokines en costimulatoire moleculen beïnvloedt. Modulatie van deze signalen door bijvoorbeeld blokkerende antilichamen in combinatie met een cellulaire therapie kan essentieel zijn om een effectieve immuuntherapie voor atherosclerose te ontwikkelen. De dierexperimenten zoals beschreven in deze aanvraag zijn op dusdanige manier opgebouwd dat ze de mogelijkheid bieden om de experimentele therapieën te combineren zijn. Om bovengenoemde therapievormen te onderzoeken is het nodig om atherosclerose te induceren in proefdieren.

Voor deze experimenten zullen wij gebruik maken van genetisch gemodificeerde muizenlijnen, die door het voeren van een hoog vet en hoog cholesterol dieet (Westers-type dieet met 0.25% cholesterol) spontaan atherosclerotische plaques ontwikkelen. Dit zijn bijvoorbeeld de LDL receptor deficiënte ($LDLr^{-/-}$) muis en de apolipoproteïne E deficiënte ($apoE^{-/-}$) muis, maar ook meer gehumaniseerde muismodellen die humaan LDL en een humaan immuunsysteem bezitten zullen worden gebruikt. Deze muismodellen worden wereldwijd veelvuldig gebruikt en reeds beschikbaar in ons laboratorium, en net als bij hart- en vaatziekten patiënten leidt een verhoging van het bloed cholesterol gehalte door het geven van cholesterol-rijk voer tot het ontstaan van atherosclerotische plaques in de slagaders. Het is meermaals aangetoond dat de muismodellen, die wij gebruiken in deze studies, een goed beeld geven van de ontstekingsprocessen die ook in mensen worden gevonden. Bovendien is de samenstelling van de atherosclerotische laesie in de muis ook gekenmerkt door de aanwezigheid van foamcellen en andere immuuncellen zoals diverse soorten T cellen, B en dendritische cellen en mestcellen (Applications and Limitations of Mouse Models for Understanding Human Atherosclerosis Scheidt...Lusis, Cell Metabolism, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.001>).

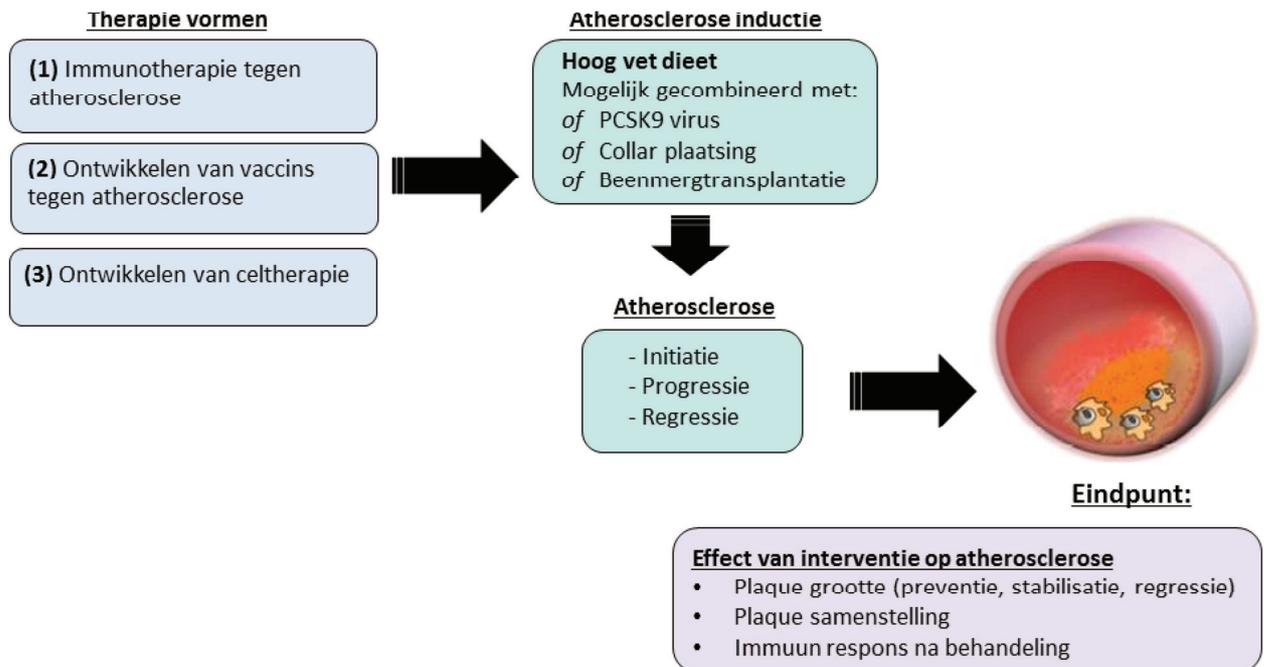
Onze algemene onderzoeksstrategie hebben we weergegeven in het onderstaande figuur. In eerste instantie zullen we immuuntherapieën individueel uittesten en alleen de succesvolle strategieën zullen we combineren met succesvolle protocollen uit de andere delen. Wij hebben in de afgelopen jaren nauwkeurig onderzocht wat het minimale aantal muizen per groep is om statistisch significantie remming (minimaal 20%) van atherosclerotische plaquevorming en regressie door therapeutisch ingrijpen aan te tonen.

In specifieke gevallen (waarschijnlijk maximaal 5% van de experimenten) zal een andere aanpak worden gebruikt om atherosclerose te induceren. We kunnen door middel van een virus dat codeert voor het enzym PCSK9 (mPCSK9-rAAV) atherosclerose induceren in wildtype muizen (C57Bl6). PCSK9 is het enzym dat betrokken is bij de afbraak van de LDL receptor in de lever. Een enkele injectie met het PCSK9 virus leidt in wildtype muizen tot op zijn minst 80 dagen na injectie een verhoogde expressie van mutant PCSK9 in de lever. Dit resulteert in een sterk verminderde expressie van de LDL receptor wat leidt tot een verhoogd plasma cholesterol gehalte. Hierdoor worden de wildtype muizen vergelijkbaar met een LDL receptor knockout muis en ontwikkelen ze atherosclerose (Bjorklund et al. Circ Res. 2014;114:1684-1689, 2014). Omdat muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen voornamelijk beschikbaar zijn op een C57Bl/6 achtergrond was het tot voor kort nodig om dubbel knockout muizen te fokken, die deficiënt zijn voor het ontstekingsgen van interesse en voor de LDL receptor om atherosclerose-studies uit te voeren. Overexpressie van PCSK9 bespaart in dit geval veel muizen omdat het uitgebreide fokprotocol niet meer nodig zal zijn.

Afhankelijk van het te onderzoeken aangrijpingspunt en de gebruikte therapie kan er daarnaast voor gekozen worden om een versnelde vorm van atherosclerose te induceren door het plaatsen van een siliconen "collar" om de halsslagaders van de muis [REDACTED]

[REDACTED] Dit model heeft als voordeel dat een atherosclerotische plaque zich relatief snel vormt, en dat daarmee de behandelingstijd verkort kan worden. Daarnaast kan middels beenmergtransplantatie (BMT) technieken, die al vele jaren binnen onze vakgroep toegepast worden, specifiek de rol van vooraf bepaalde targets in het immuunsysteem onderzocht worden. Deze verschillende therapeutische strategieën en bijbehorende experimentele modellen zijn in detail beschreven in de betreffende bijlagen.

Onderzoeksstrategie: ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuunmodulatie



De immuuntherapieën zullen worden getest in modellen van initiatie, progressie en regressie van atherosclerose. Hierdoor kunnen we onderzoeken of onze therapieën atherosclerose ontwikkeling kunnen remmen, of klinisch zeer relevant, bestaande atherosclerotische plaques kunnen stabiliseren of verminderen. Atherosclerotische parameters zoals plaque grootte, plaque samenstelling (immunohistochemie, soorten immuuncellen, ontstekingsmarkers) en serum lipide en cholesterol levels zullen worden bepaald. Daarnaast wordt het effect van de immuuntherapie op het immuunsysteem in lymfoïde organen en lokaal in de plaque uitgebreid bestudeerd door een keur aan verschillende analyses (bijv. multiplex assay voor cytokine bepalingen, T cel proliferatie assay), flow cytometry. Tijdens de experimenten zal via bloedafname vanuit de staartvene het cholesterol niveau en de immuunstatus in het bloed geanalyseerd worden, door bepaling van de verschillende T cel subklassen en de cytokine niveaus. Alvorens proefdier experimenten gestart worden, optimaliseren we de desbetreffende therapie in vitro zoals beschreven in 3.4.2. Met deze onderzoeksstrategie zullen we stap-voor-stap de onderzoeksvragen beantwoorden zonder verspilling van proefdieren.

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

Om tot een immuuntherapie te komen zullen drie verschillende experimenteel therapeutische benaderingen worden onderzocht, en mogelijk gecombineerd.

1. Immunotherapie

Het doel van deze therapie is door gebruik te maken van immuun-modulerende stoffen, zoals antilichamen, small molecules, siRNAs en cytokines, het immuunsysteem tijdens atherosclerose te zodanig te beïnvloeden dat de uitkomst van atherosclerose verbeterd wordt. Door de werking van bepaalde moleculen of cellen te stimuleren of te remmen willen wij inzicht verkrijgen in de immuunprocessen die atherosclerose veroorzaken en kunnen wij een effectieve pre-klinische immuuntherapie ontwikkelen. Wij zullen gebruik maken van immuun-modulerende stoffen zoals

antilichamen die co-stimulatoire routes moduleren (anti-OX40L, anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-Tim-1, anti-Tim-4, anti-BTLA), van chemokine receptor antagonisten (CCR2, CCR5, CXCR4 antagonisten), immunoproteasoom remmers (om antigeen presentatie te remmen) en recombinante cytokines (IL-35, IL-37) die intraperitoneaal, intraveneus of intramusculair toegediend worden. Alvorens experimenten met proefdieren worden ingezet, zal de werking van de immuun-modulerende stoffen in vitro bepaald worden. Zo zullen we voorafgaand aan een dierexperiment bepalen of bijvoorbeeld blokkerende antilichamen tegen costimulatoire moleculen zoals OX40L daadwerkelijk de signalering van deze cascade remmen in gekweekte immuuncellen. Vervolgens zal de optimale dosering vastgesteld worden aan de hand van beschikbare literatuur, informatie uit samenwerkingsverbanden of middels een doseringsstudie. Uitsluitend die therapeutica die in staat zijn om in vitro hun beoogde effect te bewerkstelligen, zullen gebruikt worden in atherosclerose experimenten. Deze stapsgewijze opbouw zorgt voor het beperken van het gebruik van proefdieren.

2. Vaccinatie tegen atherosclerose

Met behulp van vaccinaties kan een zeer gerichte, langdurige immuunrespons opgewekt worden om atherosclerose te verminderen. Verschillende vaccins zullen worden getest, zoals geïsoleerde of gesynthetiseerde eiwitten/peptiden geformuleerd in nanodeeltjes (liposomen) of verpakt in verzwakte (live-attenuated) bacteriën of virussen. De aangrijpingspunten (antigenen) waarmee T cel responsen gemoduleerd kunnen worden, zijn bijvoorbeeld peptiden gebaseerd op het apoB100 eiwit dat zich op het oppervlak van het lage-dichtheids lipoproteïne (LDL) bevindt en specifieke pro-inflammatoire cytokines (interleukines of chemokines), maar ook andere apolipoproteïnen en heat shock eiwitten. Daarnaast zullen we kijken welke vaccinatiestrategie daarbij het beste werkt. We zullen daarbij kijken naar vaccinatie strategieën die B cellen induceren, of die CD4 of CD8 T cel responsen opwekken. De vaccins zullen, afhankelijk van de gewenste werking, door middel van intramusculaire, intraperitoneale, intraveneuze, orale of subcutane injectie toegediend worden. De werkzaamheid van de vaccin formulering zal enerzijds in vitro getest worden door het antigeen te vervangen door het model antigeen ovalbumine en te testen of de gewenste T cel reactie wordt geïnduceerd, terwijl anderzijds zal worden getest of de gebruikte antigenen kunnen binden aan de T cel receptor. Na een positief in vitro resultaat, zal een atherosclerose antigeen in deze vaccin formulering geplaatst worden en in vivo worden getest, waardoor het proefdier gebruik geminimaliseerd wordt.

3. Celtherapie

In atherosclerose hebben pro-inflammatoire cellen de overhand en leidt een chronische ontsteking tot verdere ontwikkeling van atherosclerotische plaques. Middels celtherapie kan het immuunsysteem dusdanig worden gemoduleerd dat de pro-inflammatoire cellen afgeremd worden. Wij zullen hiervoor verschillende celtypen zoals bijvoorbeeld regulatoire T cellen, dendritische cellen, myeloid-derived suppressor cellen of mesenchymale stamcellen via een adoptieve transfer intraveneus toedienen aan muizen die atherosclerose ontwikkelen. Door op verschillende momenten tijdens het proces van atherosclerose, deze adoptieve cel transfer toe te passen, kunnen wij het effect van deze cellen op de ontwikkeling, progressie en regressie van atherosclerose beoordelen. We zullen gebruik maken van zowel in vitro gekweekte cellen, zoals bijvoorbeeld dendritische cellen, macrofagen, myeloid-derived suppressor cellen en mestcellen, als van cellen direct geïsoleerd uit donormuizen, zoals regulatoire T, NKT en B cellen. Door gebruik te maken van donormuizen deficiënt voor bepaalde genen die coderen voor immuun-relevante eiwitten, verkrijgen we meer inzicht in het werkingsmechanisme van immuuncellen in atherosclerose.

Voor alle onderdelen geldt dat we ook nog onbekende aangrijpingspunten in het immuunsysteem zullen onderzoeken die we in de komende 5 jaar ontdekken (zowel uit eigen experimenten als de literatuur).

Om de verschillende therapievormen te testen zullen wij voornamelijk gebruik maken van de LDL receptor deficiënte (LDLr^{-/-}) muis en de apolipoproteïne E deficiënte (apoE^{-/-}) muis. Deze genetisch gemodificeerde muizen ontwikkelen door het voeren van een dieet rijk aan vet en cholesterol (Westers-type dieet met 0.25% cholesterol) atherosclerotische plaques. Daarnaast zullen ook meer

gehumaniseerde muismodellen worden gebruikt die naast hun atherosclerotische achtergrond humaan LDL en een humaan immuunsysteem bezitten.

In specifieke gevallen (maximaal 5% van de experimenten) zal een andere aanpak worden gebruikt om atherosclerose te induceren. Muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen zijn voornamelijk beschikbaar op een C57Bl6/wildtype achtergrond. Om atherosclerose te induceren in wildtype muizen (C57Bl6) kan er gebruik gemaakt worden van een mPCSK9-rAAV. Dit virus codeert voor het enzym PCSK9 (mPCSK9-rAAV) wildtype muizen (C57Bl6) en muizen deficiënt voor een immuungen LDL receptor knockout maken omdat het PCSK9 enzym er voor zorgt dat de LDL receptor wordt afgebroken. In de muizen kunnen we dus door een enkele intraveneuze injectie van het rAAV8-D377Y-mPCSK9 gevolgd door een Westers type dieet hypercholesterolemie induceren, wat leidt tot de ontwikkeling van atherosclerose. Afhankelijk van het experiment zullen muizen gedurende 4 tot 20 weken op dit Western-type dieet blijven staan om te kijken naar initiatie, progressie en regressie van atherosclerose. Het gebruik van dit PCSK9 virus zal de benodigde hoeveelheid muizen aanzienlijk verminderen aangezien muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen niet meer naar een LDL receptor deficiënte achtergrond gefokt hoeven te worden.

Om atherosclerotische plaques te versneld te induceren in de halsslagaders zal we gebruik worden gemaakt van het collar-model dat is ontwikkeld in ons eigen laboratorium (Circulation, 103:1164-1179 (2001)). In LDLr^{-/-} of apoE^{-/-} muizen op een cholesterolrijk dieet zullen onder algehele anesthesie siliconen manchetten (collars) proximaal van de bifurcatie rond beide halsslagaders worden geplaatst. Deze collars zorgen voor een versnelde plaque vorming, waardoor 4-6 weken na de collar plaatsing plaques in een vergevorderd stadium bestudeerd kunnen worden. Specifiek kunnen we dit model gebruiken voor geneesmiddelen die we lokaal op de plaats van de plaque willen toedienen. In dat geval brengen we direct na collar plaatsing een pluronic gel met een specifiek immuun-modulerende stof aan de halsslagader aan de proximale zijde van de collar.

In bepaalde gevallen zal het wenselijk zijn om genen in beenmerg afgeleide cellen te bestuderen voor hun effect op atherosclerose. Door middel van een beenmergtransplantatie (BMT) techniek kunnen we chimere muizen creëren door beenmerg van genetische gemodificeerde muizen, die selectief het gen van interesse in de beenmerg-afgeleide cellen missen, naar acceptor LDLr^{-/-} muizen te transplanteren. Vervolgens wordt door het voeren van een Westers-type dieet de ontwikkeling van atherosclerose geïnduceerd.

De keuze voor een bepaalde techniek hangt af van het te onderzoeken aangrijpingspunt, de manier van ingrijpen en de duur van de toe te passen behandeling.

Zoals beschreven onder 3.4.1 zullen we in alle modellen aan het einde van het experiment het effect van een gekozen behadeling op atherosclerose bepalen, waarbij we niet alleen de mate van atherosclerose maar ook de plaque samenstelling, mate van ontsteking in de plaque, immuuncel populaties in lymfeknopen, bloed en milt; cholesterol en triglyceride niveaus. Door zo veel mogelijk data van elke muis te verzamelen krijgen we een goed beeld van de effectiviteit van de therapie en het beperkt het aantal benodigde proefdieren.

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

Zoals vermeld, zullen we voordat we dierproef 1, 2 of 3 gaan uitvoeren in eerste instantie de werking van de immuun-modulerende stoffen, vaccins en desbetreffende cellen in *in vitro* systemen bevestigen en waar nodig optimaliseren. Alleen bij succesvolle, significante *in vitro* immuuntherapeutische protocollen met voldoende power zullen we vervolgens de dierproeven uitvoeren.

Als er geen effect is van de behandeling bij deze *in vitro* experimenten, zal er dus geen dierproef worden gestart.

Alle onderdelen beschreven in 3.4.2 zijn gericht op het ontwikkelen van een immuuntherapie voor de behandeling van atherosclerose en hangen dus nauw met elkaar samen. Voor elk individueel experiment dat onder de drie centrale therapievormen valt (immunotherapie (1), vaccinatie (2), celtherapie (3)) zal bepaald worden welke techniek van atherosclerose inductie wordt toegepast (hoog vet dieet, PCSK9 opregulatie, collars, BMT). De keuze voor een bepaalde techniek hangt af van het te onderzoeken

aangrijpingspunt, de manier van ingrijpen en de duur van de toe te passen behandeling. De primaire uitleesparameter van al deze dierproeven is de grootte en samenstelling van de atherosclerotische plaque. Door de experimentele variatie in deze parameters is het niet mogelijk om eerst een pilot experiment met een klein aantal dieren uit te voeren, omdat dit geen statistisch betrouwbare indicatie zal geven.

We zullen na elk experiment in dierproef 1, 2 en 3 evalueren of het gewenste effect op het immuunsysteem bereikt is en of dit leidt tot remming van atherosclerose of stabilisatie van de plaque. De immuunrespons zal in kaart gebracht worden door het meten van de frequentie en activatiestatus van allerlei immuuncellen zoals T cellen, macrofagen, B cellen in bloed, lymfoïde organen en lokaal in de plaque. Mocht een behandeling geen effect hebben op de primaire uitleesparameters (plaquegrootte en samenstelling), dan zal het onderzoek naar deze immunotherapeutische behandeling niet worden gecontinueerd of verder ontwikkeld, en zal ook niet in een combinatietherapie worden gebruikt.

Als een immunotherapie wel succesvol blijkt door een significante reductie in de atherosclerose, kunnen indien nodig vervolggexperimenten worden ingezet om de behandeling te optimaliseren, of kan deze gecombineerd worden met succesvolle (cel)therapieën om een zo effectief mogelijke behandeling voor atherosclerose te ontwikkelen.

Mijlpalen per experiment zijn eenduidig omschreven in ieder individueel protocol: we kunnen plaque ontwikkeling middels plaque grootte, samenstelling en immunologische parameters nauwkeurig meten en statistische significante verschillen tussen de groepen kunnen berekenen.

Mijlpalen voor de projectonderdelen zijn:

1. Ontwikkelen van een immunotherapie tegen atherosclerose die plaque ontwikkeling en bestaande plaques kan reduceren door het ingrijpen in het immuunsysteem.
2. Ontwikkelen van vaccins tegen atherosclerose die een zeer gerichte immuunrespons opwekken waardoor atherosclerose vermindert wordt
3. Ontwikkelen van een celtherapie die pro-inflammatoire immuun responsen in atherosclerose afremt en zo atherosclerose ontwikkeling vermindert.

De voorgestelde experimenten uit dit project zullen parallel aan elkaar lopen en zullen binnen de voorgestelde tijd van 5 jaar afgerond kunnen worden. De verzamelde kennis uit ons onderzoeksproject zal bijdragen aan meer inzicht in de relatie tussen het immuunsysteem en atherosclerose. Deze kennis is nodig om tot rationeel ontworpen vormen van immunotherapie te komen die krachtig genoeg zijn om in de kliniek te testen, een traject dat we als onderzoeksgroep reeds doorlopen hebben.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Immunotherapie tegen atherosclerose
2	Vaccinatie tegen atherosclerose
3	Cellulaire therapie ter behandeling van atherosclerose
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10600	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Leiden	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Effect van immunotherapie op atherosclerose

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het primaire doel van de experimenten beschreven in deze bijlage is het therapeutische effect van immuunmodulerende stoffen, zoals antilichamen, small molecules, siRNAs en cytokines, op de initiatie, progressie en regressie van atherosclerose te bepalen. Wij zullen bestuderen of deze stoffen de basis kunnen vormen voor de ontwikkeling van geneesmiddelen ter behandeling van hart- en vaatziekten.

Wat betreft immuunmodulerende antilichamen zal de nadruk voornamelijk liggen op het testen van antilichamen tegen costimulatorische eiwitten zoals OX40L, CD40 en checkpoint inhibitors zoals PD-1/PD-L1 en Tim eiwitten en het blokkeren van inflammatoire cytokines zoals IL-12 en IL-23 door antilichamen. We zullen ook antilichamen gebruiken die bepaalde typen immuuncellen kunnen depletieren, zoals anti-CD19 antilichamen die B cellen depletieren en anti-CD8 en anti-CD4 antilichamen die T cel subsets depletieren.

Naast antilichamen zullen we ook small molecules zoals proteasoom remmers en chemokine receptor antagonisten gebruiken om de antigen-specifieke activatie van ontstekingscellen en hun rekrutering naar de vaatwand te blokkeren. Een andere mogelijkheid om de expressie van ontstekingseiwitten te remmen is het gebruik van specifieke siRNAs, die het mRNA coderend voor deze ontstekingseiwitten destabiliseert en daardoor hun expressie verlaagt. De rol van cytokines in atherosclerose zal niet alleen bestudeerd worden door antilichamen die de cytokines blokkeren, maar ook door de expressie van anti-inflammatoire cytokines (bijv. IL-35 en IL-37) te verhogen. We kunnen dit bewerkstelligen door injectie van recombinante cytokines of door overexpressie van het desbetreffende cytokine waarbij we gebruik maken van een adeno-associated of lentivirus of door elektroporatie van interleukine coderende plasmides in de dijbeenspier.

In het grootste gedeelte van het onderzoek (80-90%) zullen voor deze experimenten LDL receptor deficiënte (LDLr^{-/-}) muizen, apolipoproteïne E deficiënte (apoE^{-/-}) muizen of LDLr deficiënte muizen die het humane ApoB100 tot overexpressie brengen (LDLr^{-/-}/hapoB100^{tg}) worden gebruikt. De muizen zullen voor een bepaalde tijd (tussen 6 weken (initiële atherosclerose) en 26 weken (zeer vergevorderde atherosclerose)) op een Westers-type dieet worden geplaatst om het plasma cholesterolniveau te verhogen en spontane atherosclerose in het driekleppen gebied van de aorta (= waar de aorta het hart verlaat) en de

rest van de aorta te induceren. Gedurende de ontwikkeling van deze spontane atherosclerose zal de behandeling worden gegeven. Tevens kunnen bovenstaande behandelingen worden toegepast om het effect van de behandeling in latere stadia van atherosclerose te meten.

In enkele specifieke gevallen (elk maximaal 5%) kan, naast de inductie van atherosclerose door het voeren met een westers type dieet, gekozen worden voor een van de hieronder gespecificeerde experimentele benaderingen (A, B of C):

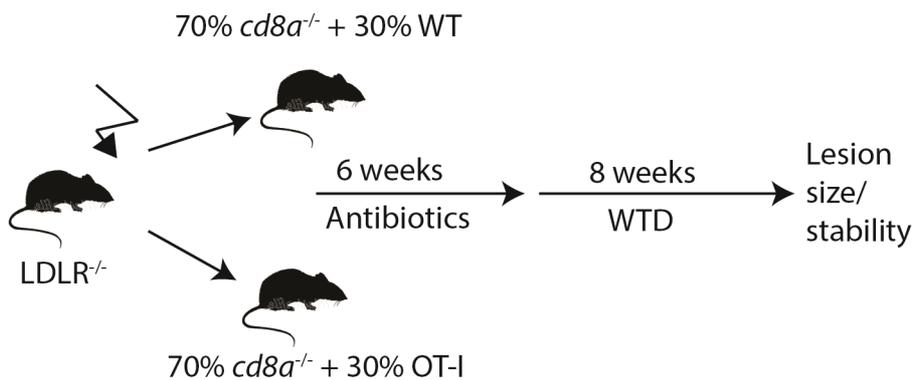
A) Teneinde versneld atherosclerotische plaques te ontwikkelen in de halsslagaders, kan gebruik worden gemaakt van het zogeheten collar-model. Dit model voor versnelde ontwikkeling van atherosclerotische plaques in de halsslagader van hyperlipidemische muizen (LDLr^{-/-}, LDLr^{-/-}/hApoB100tg of apoE^{-/-} muizen) is binnen ons laboratorium ontwikkeld en beschreven door [REDACTED]

[REDACTED]. De plaques die op deze manier geïnduceerd worden vormen een relevant model voor humane plaques, aangezien de plaques op een sterk vergelijkbare wijze zijn opgebouwd. Atherosclerotische plaques zullen versneld vormen, waarbij na 4 weken wordt gekeken naar zogeheten plaque progressie, en na 6 weken naar vergevorderde plaques, afhankelijk van de toepassing. Dit model zal worden gebruikt om het therapeutisch effect te bepalen van bijvoorbeeld small molecules, siRNAs of antilichamen, die systemisch zullen worden toegediend zoals beschreven in de aanvraag.

Dit model zal met name gekozen worden als er maar een relatief korte behandelingsduur mogelijk is. Dit model heeft daarnaast als groot voordeel dat de vaatwand lokaal behandeld kan worden, zonder systemische bijeffecten, waardoor het directe effect op de atherosclerotische plaque bepaald kan worden. In sommige gevallen zullen genen kunnen lokaal tot overexpressie worden gebracht middels virale transductietechnieken (adenoviraal; GGO nummer 02038, lentiviraal; GGO nummer 02235, of AAV; GGO nummer 08013).

B) Muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen zijn voornamelijk beschikbaar op een C57Bl6/wildtype achtergrond. Om atherosclerose te induceren in wildtype muizen (C57Bl6) kan er gebruik gemaakt worden van een mPCSK9-rAAV. PCSK9 is een enzym dat door binding aan de LDL receptor de afbraak van de LDL receptor in de lever versnelt. Middels een enkele injectie van het rAAV8-D377Y-mPCSK9 (GGO nr. IG-08013), dat codeert voor een gemuteerde vorm van het muis PCSK9 enzym (lever-specifiek), hebben wildtype muizen tot ten minste 80 dagen na injectie een verhoogde expressie van mutant PCSK9 in de lever. Dit resulteert in een zeer sterke downregulatie van de LDL receptor in de lever en dit leidt tot een verhoogd plasma cholesterol waardoor C57Bl6 muizen atherosclerose ontwikkelen (Bjørklund et al. Circ Res. 2014;114:1684-9). Door dit ook toe te passen op muizen deficiënt voor immuun genen kunnen we de rol van deze immuun genen vast stellen zonder de muizen terug te kruisen op een LDLr^{-/-} of apoE^{-/-} achtergrond.

C) Om de rol van specifieke leukocyt populaties op de ontwikkeling van atherosclerose te bepalen kan gebruik gemaakt worden van een beenmerg transplantatie. De muizen worden hierbij bestraald met 2x4.5 Gray gamma straling, waardoor het beenmerg van deze dieren uitgeschakeld wordt (onze afdeling heeft meer dan 20 jaar ervaring met deze methode). De volgende dag ontvangen de dieren beenmerg van donor muizen (zie figuur 1). In de weken na de beenmerg transplantatie zal dit donor beenmerg uitgroeien en het complete hematopoietische systeem van de ontvanger muis vervangen. Hierdoor ontstaat een chimere muis, waarbij het fenotype van de leukocyten afhankelijk is van het donor beenmerg. In het voorbeeld van figuur 1 ontvangen de muizen een mix van beenmerg van CD8^{-/-} donoren en wildtype of OT-I transgene muizen. Het resultaat van een dergelijk beenmerg transplantatie is dat de ontvangers van de CD8^{-/-}:OT-I mix geen cytotoxische T cellen heeft, die specifiek zijn voor antigenen betrokken bij atherosclerose. Door deze dieren na de complete reconstitutie van het beenmerg een Westers type dieet te voeren kunnen we de invloed van deze groep CD8 T cellen op de pathogenese van atherosclerose bestuderen.



Figuur 1: Voorbeeld proefopzet voor het bepalen van de rol van antigeen specifieke T-cellen in atherosclerose. Door het OT-I beenmerg te vervangen met andere soorten beenmerg, kunnen andere type T-cellen worden onderzocht.

De primaire uitkomstparameters van alle hierboven beschreven experimentele aanpakken zijn de effecten van de immuun-modulerende behandeling (immunotherapie) op:

- atherosclerose: de plaquegrootte in het hart, in de aorta en in de halsslagaders (in geval van collar plaatsing) wordt exact gekwantificeerd (in μm^2) en de plaque samenstelling wordt bepaald op parameters als aantallen immuuncellen, collageengehalte en oppervlak necrotische kern.
- activatie status van immuuncellen in bloed, organen en lokaal in de plaque (expressie van bepaalde activatiemoleculen door de verschillende celtypen bepaald middels flow cytometrie)
- cholesterol en triglycerideniveaus in bloed
- cytokine niveau en expressie in bloed en weefsels (lymfeklieren, milt, lever, beenmerg)

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

Afhankelijk van het aangrijpingspunt van de studie (zie hoofdvraag) en de mogelijkheden van interferentie (bijvoorbeeld de beschikbaarheid van blokkerende antilichamen, small molecules, siRNA) zal er gekozen worden voor een bepaalde manier van ingrijpen. Dit kan zijn door het toedienen van antilichamen of recombinant eiwitten, small molecules, siRNAs of door overexpressie van cytokines. De verschillende mogelijkheden van toediening zijn hieronder beschreven:

Toedienen van antilichamen of recombinante eiwitten:

- Intraperitoneaal (maximaal 100 microliter per injectie, injectie frequentie verschilt per antilichaam/eiwit normaliter 2-3x per week)
- Intraveneus (maximaal 100 microliter per injectie, injectie frequentie verschilt per antilichaam/eiwit, normaliter 2-3x per week)

Toediening van small molecules:

- Intraperitoneaal (maximaal 100 microliter per injectie, injectie frequentie verschilt per molecuul, normaliter 2-3x per week)

Toediening van siRNAs:

- Intraveneus of intraperitoneaal, afhankelijk van de toepassing (maximaal 100 microliter (i.v./i.p) per injectie, frequentie verschilt per siRNA, normaliter eenmalig)

Overexpressie van cytokines of andere immuun gerelateerde eiwitten:

- Lentivirale overexpressie: het beïnvloeden van de expressie van cytokines willen we bewerkstelligen door gebruik te maken van overexpressie van de eiwitten zelf of overexpressie van zogeheten soluble receptoren die het interleukine neutraliseren. In de muizen wordt in de dijbeenspieren een leeg lentivirus of een lentivirus (10^7 virusdeeltjes in 30 μL , GGO IG-02235), dat codeert voor een interleukine, ingespoten.
- Overexpressie door electroporatie van een voor een interleukine coderend plasmide: een alternatief voor de virusinjecties is het injecteren van een plasmide, dat codeert voor het desbetreffende cytokine

gevolgd door een electroporatie van het plasmide in de dijbeenspier. De muizen krijgen eerst een injectie van 30 microliter hyaluronidase in de dijbeenspier. Na een uur worden de muizen met isofluraan verdoofd. Onder volledige anesthesie krijgen de muizen een injectie van 30 microliter in elke dijbeenspier die een plasmide coderend voor het desbetreffende cytokine opgelost in buffer bevat, direct gevolgd door de electroporatie. De electroporatie bestaat uit 8 pulsen met een lengte van 10 milliseconden en 200V/cm met een interval van 1 seconde.

Per experiment zal worden bepaald wat de meest optimale behandelingsmethode zal zijn op basis van literatuur en in vitro experimenten om het risico op een vals negatief resultaat te verminderen. De keuze zal worden toegelicht in het desbetreffende OZP.

Monster neming voor analyse gedurende experiment:

Afhankelijk van de onderzoeksvraag (plaque initiatie, plaque progressie, behandeling van vergevorderde plaques, plaque regressie) zal een experiment tussen de 6 en 26 weken duren. Elke twee weken zal bloed worden afgenomen via staartsnede (2 weken, 100 microliter per bloedafname) om de concentratie van de toegediende immuun modulerende stof of concentratie van het chimere eiwit te volgen. Ook zal in hetzelfde serum monster een set aan ontstekingsfactoren (bv TNF-alpha, IL-12, IL-4, IL-5, IL-6) worden bepaald middels een Luminex (ELISA) assay om ontstekingsreacties te bekijken.

Euthanasie ter beëindiging experiment:

Aan het einde van het experiment zullen voorafgaand aan het perfunderen van de weefsels de dieren een geschikte anesthesie toegediend krijgen, die voorkomt dat het dier ongemak zal ondervinden gedurende de perfusie met PBS. Na perfusie worden de weefsels van interesse en plasma/serum voor ex vivo/in vitro analyse naar het laboratorium gebracht voor verdere analyse.

Bij bepaalde experimenten zal gekozen worden voor een specifieke experimentele aanpak (A, B of C):

A) Collar-operatie:

- De muizen gedurende het gehele experiment op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden (vanaf 2 weken voor de operatie). Onder algehele adequate anesthesie zullen siliconen manchetten (zogenoemde collars) geplaatst worden rond beide halsslagaders van de hierboven beschreven muizen proximaal van de bifurcatie; na plaatsing zal de incisie gehecht worden met zijden hechtdraad en kunnen de muizen herstellen gedurende minimaal 24 uur waarbij de pijn verlicht zal worden door een subcutane injectie van buprenorphine (0.1 mg/kg).

- In geval van lokale behandeling zal blootstelling met bepaalde stoffen of virale transductie van de vaatwand via de adventitiële zijde plaatsvinden. Hierbij wordt direct na de collarplaatsing een pluronic gel (vloeibaar bij 4 graden C, stolt bij 37 graden C, 10 microliter per bloedvat) die het betreffende virus bevat, geplaatst op het bloedvat aan de proximale zijde van de collar.

B) PCSK9-AAV:

De muizen zullen middels 1 intraveneuze injectie 5 tot 10 x10¹¹ genome copies rAAV8-D377Y-mPCSK9 ontvangen in een volume van 100 microliter. 0 tot 7 dagen na injectie van het PCSK9 virus zullen de muizen op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden ter bevordering van atherosclerose ontwikkeling.

Muizen zullen afhankelijk per experiment gedurende 4 tot 26 weken op dit speciale cholesterol-rijke dieet blijven staan om verschillende stadia van atherosclerose te bestuderen.

C) Beenmergtransplantatie:

De dieren worden gehuisvest in gesteriliseerde IVC kooien en zullen een week voor aanvang van de beenmerg transplantatie antibiotica (83 mg/l ciprofloxacin, 67 mg/ polymyxine B sulfaat en 6.5 g/l suiker) in hun drinkwater krijgen om de kans op infecties te verkleinen. Het endogene beenmerg van de ontvanger zal worden uitgeschakeld volgens een geëvalueerd protocol. Hiertoe worden muizen 1 dag voor de transplantatie bestraald met 2x4.5 Gy (0.19 Gy/min, 200 kV, 4 mA) röntgenstraling, gebruik makende van een Andrex Smart 225 met een 6 mm aluminium filter. De volgende dag worden de muizen intraveneus geïnjecteerd via de staartvene met minimaal 5x10⁶ donorbeenmergcellen in 200 µl fysiologische zoutoplossing. Deze donor cellen worden geïsoleerd uit de tibia en femur van donoren nadat deze geëuthanaseerd zijn middels cervicale dislocatie. Na de transplantatie zullen de dieren nog 6 weken antibiotica in hun drinkwater krijgen. In het uitzonderlijke geval dat de dieren na transplantatie verzwakt zijn, zullen de dieren gedurende 2 weken na de transplantatie naast het standaardvoer een papje worden aangeboden. Na 8 weken zal bloed afgenomen worden via staartsnede om te bepalen of de transplantatie succesvol is geweest. Vervolgens krijgen de dieren een westers type dieet voeding gedurende 8 tot

maximaal 26 weken.

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

In alle studies die wij zullen uitvoeren is de mate van atherosclerose (plaquegrootte) de belangrijkste uitleesparameter en dit blijkt ook de parameter met de grootste standaard afwijking (25%). Onderstaande parameters zijn gebaseerd op eigen jarenlang onderzoek en geven aan dat een groepsgrootte van 15 muizen gebruikt kan worden om betrouwbare statistische resultaten te verkrijgen.

Statistische parameters:

Onbetrouwbaarheidsdrempel 5%

Onderscheidend vermogen 80%

Coëfficiënt (tweezijdig toetsen) 21

Verificatienorm 10%

Meetbaar effect 35%

Standaard afwijking 25%

Het aantal benodigde dieren (n) per groep volgens de formule $n = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha/2} - Z_p)(VC/100)m_1}{(m_1 - 100)} \right] \exp^2$ is: $2 \left[\frac{(1.96 - (-0.855))(25/100)135}{135 - 100} \right] \exp^2 = 2 \left[\frac{(2.815 \times 0.25 \times 135)}{35} \right] \exp^2 = 14.7$. Dit betekent 15 muizen per groep.

Experimenten bestaan doorgaans uit twee groepen (een controle groep en een groep die de immuunmodulerende stof ontvangt) of drie groepen (controle groep met PBS behandeld, controle antilichaam en blokkerend antilichaam), waardoor een standaard experiment uit 30-45 muizen bestaat. Indien mogelijk worden experimenten gecombineerd om het aantal controle groepen te reduceren.

B. De dieren

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

Muizen op een C57Bl6 achtergrond zijn verkregen via Jackson Laboratories of via samenwerking. Dit betreft LDLr^{-/-}, LDLr^{-/-}/hApoB100tg en apoE^{-/-} muizen, en daarnaast muizen met een deficiëntie van het gen van interesse op een C57Bl6 of hyperlipidemische achtergrond, met bijbehorende controle muizen. De voor deze proeven vereiste muizen zullen worden verkregen uit eigen fok in het [REDACTED] te Leiden.

Voor deze experimenten zullen we LDL receptor of ApoE deficiënte dieren gebruiken die op een Westers type dieet (0.25% cholesterol) atherosclerose ontwikkelen. Ook meer gehumaniseerde muizenstammen zullen worden gebruikt die humaan apoB100 tot overexpressie brengen in combinatie met humaan antigen presenterende moleculen (HLA-DR). Wij zullen voor ons onderzoek zowel mannelijke als vrouwelijke muizen gebruiken.

Per experiment, na overweging van de resultaten van eerdere experimenten, wordt bepaald welke groepen er nodig zullen zijn en hoeveel dieren er nodig zijn. Voor aanvang van de experimenten zullen protocollen geschreven worden, ter beoordeling van de IVD, die groepsgroottes bevatten bepaald op basis van jarenlange ervaring gecombineerd met statistische berekeningen (15 dieren per groep, zie bovenstaande statistiek). We zullen daarbij volwassen dieren gebruiken (8-12 weken oud).

Zoals aangegeven in de hoofdaanvraag zijn er een aantal processen in het immuunsysteem, die een effect kunnen hebben op de ontwikkeling van atherosclerose. In elk van deze processen kan ingrijpen noodzakelijk zijn om het proces van atherosclerose gunstig te beïnvloeden. De aangrijpingspunten die onderzocht zullen worden zijn: CD40, OX40L, checkpoint inhibitors PD-1/PD-L1, Tim eiwitten, BTLA, Fcγ en Fcε receptoren, CD19, mestcel activatoren, chemokine receptoren zoals CCR2 en CCR5, miRNAs 494 en 329, en cytokines zoals IL-35 en IL-37. Daarnaast zullen ook tot op heden onbekende aangrijpingspunten in het immuunsysteem onderzocht worden.

De immunologie is een zeer dynamisch onderzoeksveld, waarin in de komende 5 jaar een naar verwachting aanzienlijk aantal nieuwe moleculen en regelsystemen ontdekt zal worden. Wij verwachten daarom dat wij in 5 jaar ongeveer 70 experimenten zullen doen, van gemiddeld 2 groepen (controle en behandeling), wat neerkomt op 15 muizen per groep x 2 groepen = 30 muizen per experiment x 70 experimenten = maximaal 2100 muizen.

Bij een beenmergtransplantatie-experiment zal beenmerg worden geïsoleerd uit donormuizen. Uit ervaring weten we dat we per 5 ontvangermuizen 1 donormuis nodig zullen hebben. Dit zal uitkomen op 42 donoren

(~7 experimenten met BMT=7 x 30 dieren=210 dieren/5=42).
Dit maakt het totaal 2142 muizen.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Om aan te tonen dat de genoemde immuun modulerende stoffen een effect hebben op de verschillende stadia van atherosclerose zijn *in vivo* modellen nog steeds noodzakelijk. Atherosclerose (en met name plaqueruptuur) is het pathologisch resultaat van een veranderde samenstelling van de vaatwand en een verstoorde communicatie tussen een groot aantal verschillende celtypen. De complexiteit van onderliggende mechanismen (ontsteking in de plaque en in de lymfoïde organen, apoptose, matrixremodelling), het onderlinge samenspel van de verschillende celtypen aanwezig in een atherosclerotische plaque en de bijdrage van componenten in de bloedsomloop aan de pathofysiologie impliceren dat *in vitro* studies (en met name single cell systemen), en daarmee vervanging van proefdieren, slechts op zeer beperkte schaal mogelijk zijn.

Vervanging: Wij hebben human plaques beschikbaar waarin we de aanwezigheid van specifieke immuuncellen kunnen aantonen, en met deze cellen kunnen immuunmodulerende stoffen *in vitro* worden getest. Waar mogelijk zullen ook *in vitro* experimenten worden gedaan in assays (zoals migratieassay met transwell systemen) gebaseerd op de volgende cellijnen: RAW264.7 cellen (muis macrofaag cellijn), H5V cellen (endotheel cellijn), gladde spiercellen en MC9/G8 cellen (muis mestcellijn). Atherosclerose is echter een complexe ziekte die tot stand komt door een combinatie van voeding, cholesterol homeostase in de lever en cholesterol afvoer via de gal, ontstekingsreacties in lymfoïde organen en de migratie van immuuncellen vanuit beenmerg en lymfoïde organen naar de plaques in de slagader. Effecten van door ons te onderzoeken stoffen die dit complexe proces beïnvloeden zijn daarom niet volledig te testen in uitsluitend *in vitro* modellen. Het blijft daarom noodzakelijk om het effect van experimentele geneesmiddelen op het complexe proces van atherosclerose te onderzoeken via *in vivo* experimenten.

Vermindering: Om atherosclerose-studies in muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen uit te voeren moesten deze muizen tot op heden teruggekruist worden naar een LDL-receptor deficiënte achtergrond wat veel muizen en tijd kost. De rAAV8-D377Y-mPCSK9 vector zoals beschreven zal gebruikt worden om de ontwikkeling van atherosclerose in muizen op een C57Bl6 achtergrond te stimuleren als alternatief voor het terugkruisen op een LDLr deficiënte achtergrond en zo de hoeveelheid muizen nodig voor atherosclerose onderzoek aanzienlijk verminderen. Door uit te gaan van humane plaques kunnen we de relevante targets voor immunotherapie in de mens definiëren en voorkomen we dat we targets gaan testen die alleen in het proefdier relevant zijn. Dit model zal alleen worden toegepast als het om een gen-deficiënte muis gaat, en zal niet worden toegepast voor interventiestudies.

Verfijning: het experimentele protocol is zodanig geoptimaliseerd, dat er met een minimaal aantal dieren volstaan kan worden: uit de ervaring van de divisie ██████████ op het gebied van hart- en vaatziekten is gebleken dat er een bepaald aantal dieren nodig is om in de vaatwand een meetbaar effect van een behandeling significant te kunnen waarnemen. Voor de optimale dosering van antilichamen en small molecule drugs zullen *in vivo* pilots uitgevoerd worden om het experimentele protocol verder te verfijnen. Voor aanvang van de dierexperimenten waarbij overexpressie van immuun gerelateerde eiwitten/cytokines wordt onderzocht, zal voor elk construct *in vitro* worden bepaald of er daadwerkelijk functionele cytokines/receptoren worden gemaakt. Constructen zullen *in vitro* tot overexpressie worden gebracht en worden getest op hun functionaliteit door middel van bio-assays.

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

Om angst bij de dieren tot een minimum te beperken zullen muizen niet alleen gehuisvest worden, maar altijd met meerdere muizen in aanwezigheid van kooiverrijking (kartonnen rol, papier en bijthoutje). Teneinde ongerief/pijn te verminderen zal direct na de microchirurgische handelingen gedurende tenminste 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buprenorphine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval). Daarnaast zullen muizen, die met het PCSK9-AAV behandeld worden, gehuisvest worden in de DM-II faciliteit, waarna bij het verschonen het afval ter destructie wordt afgevoerd zodat het niet in het milieu terecht komt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Teneinde het ongerief te verminderen zal direct na de microchirurgische handelingen gedurende minimaal 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buprenorfine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval). Mochten er langer kenmerken van pijn waarneembaar zijn wordt deze

pijnbestrijding gecontinueerd zolang nodig.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Bij een operatie voor collar plaatsing kan de plaatsing van de ligatuur kan incidenteel het syndroom van Horner tot gevolg hebben door beschadiging van de perivasculaire sympathische zenuwen, waarbij partiële ptosis van het ooglid kan ontstaan. Het zicht wordt hierdoor matig belemmerd.
In het geval van een beenmergtransplantatie kan in enkele gevallen gewichtsverlies en intestinale problemen (diarree, bloeding) voorkomen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Collar: De plaatsing van het ligatuur kan incidenteel het syndroom van Horner tot gevolg hebben.
BMT: Het donor beenmerg kan afgestoten worden (host versus graft disease) of het donor beenmerg kan Een immuun reactie voorzaken (graft versus host disease). Doordat wij uitsluitend kiezen voor een beenmergdonor (graft) en acceptor (host) op een zelfde C57Bl6 achtergrond wordt dit probleem vrijwel geheel voorkomen.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord door de onderzoeker en de dierversorgers en wanneer deze symptomen (syndroom van Horner, sterk gewichtsverlies, intestinale problemen) worden geconstateerd zal het desbetreffende dier worden geëuthanaseerd.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Een dier zal voortijdig worden geëuthanaseerd indien de volgende gezondheidsproblemen zich voordoen om het ongerief voor het betreffende dier te beperken:

- meer dan 15% gewichtsverlies in 2 dagen of meer dan 20% gewichtsverlies ten opzichte van het begin van het experiment. Het gewicht van de muizen zal daarom om de dag worden gemeten in de eerste dagen na een collar-operatie en na een beenmergtransplantatie.
- Zichtbaar lijden (trillen/apathie/verwondingen door kooigenoten etc.)

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

Uit ervaring uit soortgelijke experimenten is gebleken dat minder dan 3% van de dieren voldoet aan deze criteria in een experiment zonder chirurgische handelingen. In geval van het plaatsen van een collar of het ondergaan van een beenmergtransplantatie zal ongeveer 10% van de dieren een van deze criteria halen.

K. Classificatie van ongerief

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

ongerief ingeschat op matig. De dieren in totaal 9 gray röntgenstraling ontvangen met een daarop volgende, tijdelijke immundeprivatie. Hoewel uitzonderlijk, bestaat de kans dat het beenmerg na de transplantatie niet aanslaat. Dit gaat in de meeste gevallen samen met een gewichtsafname van de muizen (>20% in twee dagen) en in dat geval zal tot voortijdige euthanasie worden besloten. De dieren zullen daarom ook in de eerste twee weken zeer regelmatig gewogen worden(om de dag), en na deze twee weken elke week. We verwachten dat we in ongeveer 10% van het totaal aantal benodigde dieren een BMT zullen gaan uitvoeren (~7 experimenten met BMT=7 x 30 dieren=210 dieren).

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om te bepalen of behandeling met immuun-modulerende stoffen de mate van atherosclerose ontwikkeling vermindert en dus gebruikt kan worden als potentiële immunotherapie om hart- en vaatziekten te voorkomen of verminderen, is het essentieel om het hart, de aorta en immuun gerelateerde organen (milt, lymfeknopen) te verkrijgen voor analyse.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10600	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Leiden	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Vaccinatie tegen atherosclerose

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Deze experimenten hebben ten doel om de effectiviteit van vaccins tegen atherosclerose te testen. Bij het testen van vaccins is het gebruik maken van diermodellen onontbeerlijk, aangezien er geen bestaande *in vitro* modellen van atherosclerose zijn en de complexe interacties van immuuncellen, die ontstaan na toediening van een vaccin evenmin na te bootsen zijn *in vitro*. Wij zullen daarom gebruik maken muismodellen voor atherosclerose. Wanneer deze muizen gevoerd worden met een dieet met een verhoogde hoeveelheid vetten en cholesterol (Westers Type Dieet, WTD), ontwikkelen deze dieren binnen enkele weken atherosclerotische plaques in het hart en de grote slagaderen zoals de aorta. De locatie van de plaques en de samenstelling van de plaques is vergelijkbaar met de menselijke situatie. Door deze dieren op verschillende momenten gedurende de ontwikkeling van atherosclerose een vaccin toe te dienen kunnen wij het effect van vaccinatie op atherosclerose beoordelen.

In het grootste gedeelte van het onderzoek (80-90%) zullen voor deze experimenten LDL receptor deficiënte (LDLr^{-/-}) muizen, apolipoproteïne E deficiënte (apoE^{-/-}) muizen of LDLr^{-/-} deficiënte muizen die het humane ApoB100 tot overexpressie brengen (LDLr^{-/-}/hApoB100^{tg}). De muizen zullen voor een bepaalde tijd (tussen 6 (initiële atherosclerose) en 16 weken (vergevoerde atherosclerose)) op een Westers-type dieet worden geplaatst om spontane atherosclerose in het hart en de aorta te induceren. Tegelijkertijd zal een vaccin worden toegediend om het effect van dit vaccin op de ontwikkeling van atherosclerose te bepalen.

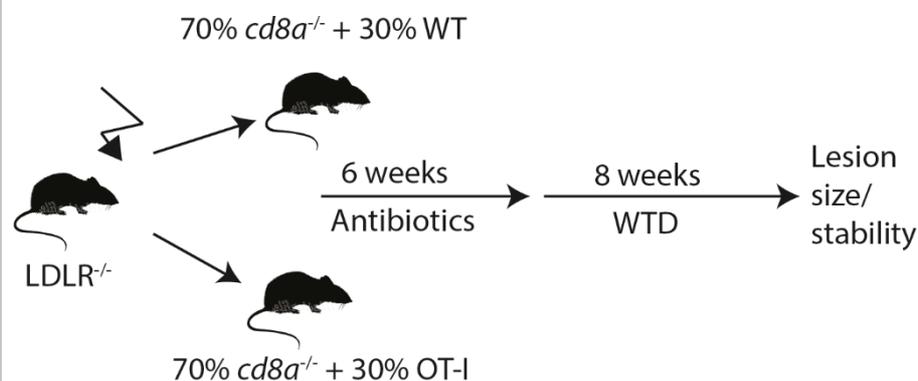
In enkele specifieke gevallen (elk maximaal 5%) kan, naast de inductie van atherosclerose door het voeren met een westers type dieet, gekozen worden voor een van de hieronder gespecificeerde experimentele benaderingen (A, B of C):

A) Teneinde versneld atherosclerotische plaques te ontwikkelen in de halsslagaders, kan gebruik worden gemaakt van het zogeheten collar model te gebruiken. Dit model voor versnelde ontwikkeling van atherosclerotische plaques in de halsslagader van hyperlipidemische muizen (LDLr^{-/-}, LDLr^{-/-}/hApoB100^{tg} of apoE^{-/-} muizen) is binnen ons laboratorium ontwikkeld en beschreven door [REDACTED]

De plaques die op deze manier geïnduceerd worden vormen een relevant model voor humane plaques, aangezien de plaques op dezelfde wijze zijn opgebouwd. Atherosclerotische plaques zullen versneld vormen, waarbij na 4 weken wordt gekeken naar zogeheten plaque progressie, en na 6 weken naar vergevorderde plaques, afhankelijk van de toepassing.

B) Muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen zijn voornamelijk beschikbaar op een C57Bl6/wildtype achtergrond. Om atherosclerose te induceren in wildtype muizen (C57Bl6) kan er gebruik gemaakt worden van een mPCSK9-rAAV. PCSK9 is een enzym dat door binding aan de LDL receptor de afbraak van de LDL receptor in de lever versneld. Middels een enkele injectie van het rAAV8-D377Y-mPCSK9 (GGO nr. IG-08013), wat codeert voor een gemuteerde vorm van het muis PCSK9 enzym (lever-specifiek), hebben wildtype muizen tot ten minste 80 dagen na injectie een verhoogde expressie van mutant PCSK9 in de lever. Dit resulteert in de downregulatie van de LDL receptor in de lever en dit leidt tot verhoogd plasma cholesterol waardoor wildtype muizen atherosclerose zullen ontwikkelen (Bjørklund et al. *Circ Res.* 2014;114:1684-9).

C) Om de rol van specifieke leukocyt populaties op het effect van een vaccinatie en atherosclerose te bepalen kan gebruik gemaakt worden van een beenmerg transplantatie. De muizen worden hierbij bestraald met 2x4.5 Gray gamma straling, waardoor het beenmerg van deze dieren uitgeschakeld wordt. De volgende dag ontvangen de dieren beenmerg van donor muizen (zie figuur 1). In de weken na de BMT zal dit donor beenmerg uitgroeien en het complete hematopoietische systeem van de ontvanger muis vervangen. Hierdoor ontstaat een chimere muis, waarbij het fenotype van de leukocyten afhankelijk is van het donor beenmerg. In het voorbeeld van figuur 1 ontvangen de muizen een mix van beenmerg van $CD8^{-/-}$ donoren en wildtype of OT-I transgene muizen. Het resultaat van een dergelijk beenmerg transplantatie is dat de ontvangers van de $cd8^{-/-}$:OT-I mix geen cytotoxische T cellen heeft, die specifiek zijn voor antigenen betrokken bij atherosclerose. Door deze dieren na de complete reconstitutie van het beenmerg een Westers type dieet te voeren kunnen we de invloed van deze groep CD8 T cellen op de pathogenese van atherosclerose bestuderen.



Figuur 1: Voorbeeld proefopzet voor het bepalen van de rol van antigeen specifieke T-cellen in atherosclerose. Door het OT-I beenmerg te vervangen met andere soorten beenmerg, kunnen andere type T-cellen worden onderzocht.

De primaire uitkomstparameters van alle hierboven beschreven experimentele aanpakken zijn de effecten van de immuun-modulerende behandeling op:

- atherosclerose: de plaquegrootte wordt exact gekwantificeerd (in μm^2) en de plaque samenstelling wordt bepaald op parameters als aantallen immuuncellen, collageengehalte en oppervlak necrotische kern.
- activatie status van immuuncellen in bloed, organen en lokaal in de plaque (expressie van bepaalde activatiemoleculen door de verschillende celtypen bepaald middels flow cytometrie)
- antistof titers opgewekt door het toegediende vaccin
- cholesterol en triglycerideniveaus in bloed
- cytokine niveau en expressie in bloed en weefsels (lymfeklieren, milt, lever, beenmerg)

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

Dieren zullen worden gevaccineerd door middel van een intramusculaire, intraperitoneale, intraveneuze of subcutane injectie of door orale toediening via een maagsonde. Verschillende vaccins zullen worden getest, zoals geïsoleerde of gesynthetiseerde eiwitten/peptide geformuleerd in nanodeeltjes of verzwakte bacteriën/virussen. De geïnjecteerde vaccins zullen maximaal 3x worden toegediend in een tijdsbestek van 6 weken na de eerste toediening, 1 week na elke toediening zal door middel van staartsnede bloed afgenomen worden om het effect van de immunisatie te bepalen. De orale toediening van een vaccin zal 4 keer plaatsvinden om de andere dag in een tijdsbestek van 8 dagen en het effect van deze vaccinatie zal onderzocht worden op 7 en 14 dagen na de laatste orale toediening in het bloed afgenomen door middel van staartsnede.

Om het preventieve effect van de verschillende vaccinaties te meten, zal na afloop van de laatste immunisatie gestart worden met het voeren van WTD voor een periode van maximaal 16 weken (profylaxis experiment). Als het therapeutisch effect van het vaccin bepaald dient te worden, wordt eerst atherosclerose geïnduceerd door het voeren van een WTD, waarna na 6 weken de eerste immunisatie zal worden toegediend volgens bovenstaande methodes. Voor aanvang van het experiment, voor de eerste immunisatie en 1 week na de immunisatie zal bloed afgenomen worden door middel van staartsnede (max 4x in 8 weken).

Na maximaal 16 weken van WTD zullen de dieren geëuthanaseerd worden door middel van het toediening van een overdosis geschikt anestheticum worden toegepast gevolgd door perfusie.

Bij bepaalde experimenten kan gekozen worden voor een specifieke experimentele aanpak (A, B of C):

A) Collar-operatie:

De muizen gedurende het gehele experiment op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden (vanaf 2 weken voor de operatie). Onder algehele adequate anesthesie zullen siliconen manchetten (zogenoemde collars) geplaatst worden rond beide halsslagers van de hierboven beschreven muizen proximaal van de bifurcatie; na plaatsing zal de incisie gehecht worden met zijden hecht draad en kunnen de muizen herstellen gedurende minimaal 24 uur waarbij de pijn verlicht zal worden door een subcutane injectie van buprenorphine (0.1 mg/kg).

B) PCSK9-AAV:

De muizen zullen middels 1 intraveneuze injectie 5 tot 10 $\times 10^{11}$ genome copies rAAV8-D377Y-mPCSK9 ontvangen in een volume van 100 microliter. 0 tot 7 dagen na injectie van het PCSK9 virus zullen de muizen op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden ter bevordering van atherosclerose ontwikkeling.

Muizen zullen afhankelijk per experiment gedurende 4 tot 16 weken op dit speciale cholesterol-rijke dieet blijven staan om verschillende stadia van atherosclerose te bestuderen.

C) Beenmergtransplantatie:

De dieren worden gehuisvest in gesteriliseerde IVC kooien en zullen een week voor aanvang van de beenmerg transplantatie antibiotica (83 mg/l ciprofloxacin, 67 mg/ polymyxine B sulfaat en 6.5 g/l suiker) in hun drinkwater krijgen om de kans of infecties te verkleinen. Het endogene beenmerg van de ontvanger zal worden uitgeschakeld volgens een geëvalueerd protocol. Hiertoe worden muizen 1 dag voor de transplantatie bestraald met 2x4.5 Gy (0.19 Gy/min, 200 kV, 4 mA) röntgenstraling, gebruik makende van een Andrex Smart 225 met een 6 mm aluminium filter. De volgende dag worden de muizen intraveneus geïnjecteerd via de staartvene met minimaal 5×10^6 donorbeenmergcellen in 200 μ l fysiologische zoutoplossing. Deze donor cellen worden geïsoleerd uit de tibia en femur van donoren nadat deze geëuthanaseerd zijn middels cervicale dislocatie. Na de transplantatie zullen de dieren nog 6 weken antibiotica in hun drinkwater krijgen. In het uitzonderlijke geval dat de dieren na transplantatie verzwakt zijn, zullen de dieren gedurende 2 weken na de transplantatie naast het standaardvoer een papje worden aangeboden. Na 8 weken zal bloed afgenomen worden via staartsnede om te bepalen of de transplantatie succesvol is geweest. Vervolgens krijgen de dieren een westers type dieet voeding gedurende 8 tot maximaal 16 weken.

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

Het primaire doel van dit experiment is om het effect van een vaccin op de grootte en samenstelling van de atherosclerotische laesie te bepalen. Daarvoor wordt één of meerdere vaccineerde groepen vergeleken met een ongevaccineerde groep. Uit afgelopen jaren is gebleken dat een groepsgrootte van 15 muizen gebruikt kan worden met betrouwbare statistische resultaten bij vergelijkbare dierproeven.

Statistische parameters:

Onbetrouwbaarheidsdrempel 5%
Onderscheidend vermogen 80%
Coëfficiënt (tweezijdig toetsen) 21
Verificatienorm 10%
Meetbaar effect 35%
Standaard afwijking 25%

Het aantal benodigde dieren (n) per groep volgens de formule $n = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha/2} - Z_p)(VC/100)m_1}{(m_1 - 100)} \right] \exp 2$ is: $2 \left[\frac{(1.96 - (-0.855))(25/100)135}{135 - 100} \right] \exp 2 = 2 \left[\frac{(2.815 \times 0.25 \times 135)}{35} \right] \exp 2 = 14.7$. Dit betekent 15 muizen per groep.

B. De dieren

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

Muizen op een C57Bl6 achtergrond zijn verkregen via Jackson Laboratories of via samenwerking. Dit betreft LDLr-/-, LDLr-/-/hApoB100tg en apoE-/- muizen, en daarnaast muizen met een deficiëntie van het gen van interesse op een C57Bl6 of hyperlipidemische achtergrond, met bijbehorende controle muizen.

De voor deze proeven vereiste muizen zullen worden verkregen uit eigen fok in het [REDACTED] te Leiden.

Voor deze experimenten zullen we LDL receptor of ApoE deficiënte dieren gebruiken die op een Westers type dieet (0.25% cholesterol) atherosclerose ontwikkelen. Ook meer gehumaniseerde muizenstammen zullen worden gebruikt die humaan apoB100 tot overexpressie brengen in combinatie met humaan antigeen presenterende moleculen (HLA-DR). Wij zullen voor ons onderzoek zowel mannelijke als vrouwelijke muizen gebruiken.

Per experiment, na overweging van de resultaten van eerdere experimenten, wordt bepaald welke groepen er nodig zullen zijn en hoeveel dieren er nodig zijn. Voor aanvang van de experimenten zullen protocollen geschreven worden, ter beoordeling van de IVD, die groepsgroottes bevatten bepaald op basis van jarenlange ervaring gecombineerd met statistische berekeningen (15 dieren per groep, zie bovenstaande statistiek). We zullen daarbij volwassen dieren gebruiken (8-12 weken oud).

Vaccins zullen in eerste instantie gericht zijn tegen het LDL eiwit apoB100. Er zijn in onze onderzoeksgroep een aantal apoB100 afgeleide peptiden (nonameren, 9 aminozuren in lengte) geïdentificeerd, die via MHC I of MHC II worden gepresenteerd aan T cellen en daarom in een vaccin effectief kunnen zijn om de immuunrespons gedurende atherosclerose te beïnvloeden. Deze peptiden zullen in deze experimenten worden getest. Daarnaast zullen in de komende jaren nieuwe peptiden worden geïdentificeerd van eiwitten die eveneens betrokken zijn bij atherosclerose, zoals heat shock eiwitten, adhesie moleculen, apolipoproteïnen. Afhankelijk van het nagestreefde doel van de vaccinatie kunnen de vaccins op verschillende manieren worden toegediend. Voor het opwekken van antilichamen tegen het antigeen worden toegediend in combinatie met een adjuvant, voor de inductie van een CD8 respons zal gekozen worden voor een live-attenuated bacterie of virus en voor de inductie van tolerantie zal gekozen worden voor een orale toediening van het peptide. De vaccins zullen vaak in verschillende doseringen en/of toedieningsroutes worden getest op hun therapeutische werking. Indien succesvol, zal het desbetreffende vaccin ook profylactisch worden getest.

Wij verwachten dat wij in 5 jaar ongeveer 60 experimenten zullen doen, van gemiddeld 4 groepen (controle en vaccin in 3 concentraties), wat neerkomt op 15 muizen per groep x 4 groepen = 60 muizen per experiment x 30 experimenten = maximaal 1800 muizen.

Bij een beenmergtransplantatie-experiment zal beenmerg worden geïsoleerd uit donormuizen. Uit ervaring weten we dat we per 5 ontvangermuizen 1 donormuis nodig zullen hebben. Dit zal uitkomen op 36 donoren (~3 experimenten met BMT=3 x 60 dieren=180 dieren/5=36).

Dit maakt het totaal 1836 muizen.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Om aan te tonen dat de genoemde vaccins een effect hebben op atherosclerose zijn *in vivo* modellen nog steeds noodzakelijk. Atherosclerose (en met name plaqueruptuur) is het pathologisch resultaat van een veranderde samenstelling van de vaatwand en een verstoorde communicatie tussen een groot aantal verschillende celtypen. De complexiteit van onderliggende mechanismen (ontsteking in de plaque en in de lymfoïde organen, apoptose, matrixremodelling), het onderlinge samenspel van de verschillende celtypen aanwezig in een atherosclerotische plaque en de bijdrage van componenten in de bloedsomloop aan de pathofysiologie impliceren dat *in vitro* studies (en met name single cell systemen), en daarmee vervanging van proefdieren, slechts op zeer beperkte schaal mogelijk zijn.

Vervanging: De werkzaamheid van de vaccin formulering kan *in vitro* getest worden door het antigen te vervangen met het model antigen Ovalbumine. Met behulp van dendritisch cellijnen en T cel lijnen kunnen wij *in vitro* testen of de ontworpen vaccin formulering de gewenste T cel reactie kan opwekken. We zullen de nonameren die de basis vormen voor de atherosclerose vaccins *in vitro* testen op cellijnen op hun capaciteit om T cellen te activeren na presentatie via dendritische cellen. Wanneer dit het geval is zal het atherosclerose antigeen in deze vaccinformulering geplaatst worden en *in vivo* getest worden. Atherosclerose is echter een complexe ziekte die tot stand komt door een combinatie van voeding, cholesterol homeostase in de lever en cholesterol afvoer via de gal, ontstekingsreacties in lymfoïde organen en de migratie van immuuncellen vanuit beenmerg en lymfoïde organen naar de plaques in de slagader. Effecten van door ons te onderzoeken stoffen die dit complexe proces beïnvloeden zijn daarom niet volledig te testen in uitsluitend *in vitro* modellen. Het blijft daarom noodzakelijk om het effect van experimentele geneesmiddelen op het complexe proces van atherosclerose te onderzoeken via *in vivo* experimenten.

Vermindering: De groepsgrootte kan worden verkleind door na elke immunisatie de T cel reactie in het bloed in plaats van de milt van de dieren te meten. Hierdoor kan een kinetisch profiel per muis worden vastgesteld zonder dat er extra muizen moeten worden gevaccineerd waarvan de milt moet worden geanalyseerd. Door zoveel mogelijk vaccins in 1 experiment te testen kan het aantal controle (onbehandelde groepen) beperkt worden. Tevens zullen we door de vaccins *in vitro* te screenen het aantal experimenten beperken, terwijl de vaccinaties alleen ontworpen zullen worden met vaccins die relevant zijn voor de humane situatie.

Verfijning: Ervaring onderzoekers zullen de de bloedafnames en vaccin injecties uitvoeren. Het experimentele protocol is zodanig geoptimaliseerd, dat er met een minimaal aantal dieren volstaan kan worden: uit de ervaring van de divisie ██████████ op het gebied van hart- en vaatziekten is gebleken dat er een bepaald aantal dieren nodig is om in de vaatwand een meetbaar effect van een behandeling significant te kunnen waarnemen.

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

De dieren worden minstens tweemaal per week gemonitord door de onderzoeker. Daarnaast worden de muizen dagelijks bekeken door de proefdierversorgers, en eventuele onverwachte problemen worden direct doorgegeven aan de betreffende onderzoeker. Zo kan onverwacht lijden worden vastgesteld en onmiddellijk gestopt. Om angst bij de dieren tot een minimum te beperken zullen muizen niet alleen gehuisvest worden, maar altijd met meerdere muizen in aanwezigheid van kooiverrijking (kartonnen rol, papier en bijthoutje). Teneinde ongerief/pijn te verminderen zal direct na de microchirurgische handelingen gedurende minimaal 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buprenorphine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval). Daarnaast zullen muizen die met het PCSK9-AAV behandeld worden gehuisvest worden in de DM-II faciliteit, waarna bij verschonen het afval ter destructie wordt afgevoerd. Dieren die behandeld worden met een levende vaccin-vector worden in de DM-II faciliteit behandeld en gehuisvest teneinde eventuele verspreiding van dit micro-organisme en blootstelling van de onderzoeker tegen te gaan.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Teneinde het ongerief te verminderen zal direct na een microchirurgische handelingen (collar-operatie) gedurende minimaal 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buphrenorphine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval). Mochten er langer kenmerken van pijn waarneembaar zijn wordt deze pijnbestrijding gecontinueerd zolang nodig.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Injectie en orale toediening van de vaccins en bloedafname kunnen tot stress en irritatie rond de injectie-

afname plek leiden. In een enkel geval kan de toediening van het vaccin tot een algemeen gevoel van ongemak kunnen leiden dat zich uit in de vorm van afname van het lichaamsgewicht en verminderde activiteit.

Vaccins die verzwakte bacteriën/virussen bevatten zijn over het algemeen veilig (bijvoorbeeld het polio vaccin, rotavirus vaccin, nasale griep vaccin en gele koorts vaccin), al is er een verhoogde kans dat deze vaccins een ontstekingsreactie veroorzaken. Dieren die dit type vaccin toegediend krijgen zullen in een MLI-faciliteit gehuisvest en behandeld worden. Bovendien zullen alle dieren in de eerste week na de toediening dagelijks gemonitord en gewogen worden.

Bij een collar operatie kan de plaatsing van de ligatuur kan incidenteel het syndroom van Horner tot gevolg hebben door beschadiging van de perivasculaire sympathische zenuwen, waarbij partiële ptosis van het ooglid kan ontstaan. Het zicht wordt hierdoor matig belemmerd.

In het geval van een beenmergtransplantatie kan in enkele gevallen gewichtsverlies en intestinale problemen (diarree, bloeding) voorkomen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Afname van het lichaamsgewicht en verminderde activiteit na toediening van het vaccin kan het gevolg zijn van een systemische ontstekingsreactie.

Collar: De plaatsing van het ligatuur kan incidenteel het syndroom van Horner tot gevolg hebben.

BMT: Het donor beenmerg kan afgestoten worden (host versus graft disease) of het donor beenmerg kan immuun reactie veroorzaken (graft versus host disease). Doordat wij uitsluitend kiezen voor een beenmergdonor (graft) en acceptor (host) op een zelfde volledige C57Bl6 achtergrond wordt dit probleem vrijwel geheel voorkomen.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord door de onderzoeker en de dierverzorgers en wanneer deze symptomen (syndroom van Horner, sterk gewichtsverlies, intestinale problemen) worden geconstateerd zal het desbetreffende dier worden geëuthanaseerd.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Een dier zal voortijdig worden geëuthanaseerd indien de volgende gezondheidsproblemen zich voordoen om het ongerief voor het betreffende dier te beperken:

- meer dan 15% gewichtsverlies in 2 dagen of meer dan 20% gewichtsverlies ten opzichte van het begin van het experiment. Het gewicht van de muizen zal daarom om de dag worden gemeten in de eerste dagen na een collar-operatie, een beenmergtransplantatie of een vaccinatie.

- Zichtbaar lijden (trillen/apathie/verwondingen door kooigenoten etc.)

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

Uit ervaring uit soortgelijke experimenten is gebleken dat <5% van de dieren deze criteria haalt in een vaccinatie-experiment zonder chirurgische handelingen. In geval van het plaatsen van een collar of het ondergaan van een beenmergtransplantatie zal ongeveer 10% van de dieren een van deze criteria halen.

K. Classificatie van ongerief

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

De dieren ontvangen een maximum van 3 injecties en er wordt maximaal 4x bloed afgenomen via staartsnede. Eventueel wordt er onder anesthesie een collar geplaatst (met pijnbestrijding). Gecombineerd wordt het ongerief ingeschat op matig. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX ongerief ingeschat op matig. Aangezien de dieren in totaal 9 gray röntgenstraling ontvangen met daarop volgende, tijdelijke immuundeprivatie. Hoewel uitzonderlijk, bestaat de kans dat het beenmerg na de transplantatie niet aanslaat. Dit wordt over het algemeen aangekondigd door een afname in het gewicht van de muizen (>20% in twee dagen) en in dat geval zal tot voortijdige euthanasie worden besloten. De dieren zullen daarom ook in de eerste twee weken gewogen worden (om de dag) en na deze twee weken elke week. We verwachten dat we in ongeveer 10% van het totaal aantal benodigde dieren een BMT zullen gaan uitvoeren

(~3 experimenten met BMT=3 x 60 dieren=180 dieren).

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om te bepalen of een vaccin de mate van atherosclerose ontwikkeling vermindert en dus gebruikt kan worden als potentiële immunotherapie om hart- en vaatziekten te voorkomen of verminderen, is het essentieel om het hart, de aorta en immuun gerelateerde organen (milt, lymfeknopen) te verkrijgen voor analyse.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10600	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Leiden	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Cellulaire therapie ter behandeling van atherosclerose

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het doel van deze dierproeven is om het effect van cellulaire therapie op atherosclerose te onderzoeken. Dit zullen we doen door een adoptieve transfer van bijvoorbeeld stamcellen, dendritische cellen of T cellen uit te voeren en vervolgens vast te stellen hoe dit de immunresponse verandert in atherosclerose gevoelige muizen en vast te stellen wat het effect op atherosclerose is.

Afhankelijk van het aangrijpingspunt zal er gekozen worden voor een experimenteel muismodel voor atherosclerose. Over het algemeen zullen LDL receptor deficiënte (LDLr^{-/-}) muizen, apolipoproteïne E deficiënte (apoE^{-/-}) muizen of LDLr^{-/-} deficiënte muizen die het humane ApoB100 tot overexpressie brengen (LDLr^{-/-}/hapoB100^{tg}) worden gebruikt. De muizen zullen voor een bepaalde tijd (tussen 4 (initiële atherosclerose) en 26 weken (zeer vergevorderde atherosclerose)) op een Westers-type dieet worden geplaatst om het plasma cholesterolniveau te verhogen en spontane atherosclerose in het hart en de aorta te induceren. Tegelijkertijd zal een van de bovengenoemde behandelingen worden toegepast om het effect van de behandeling in verschillende stadia van atherosclerose te meten.

De verschillende celtypen die getest zullen worden zullen of *in vitro* uitgekweekt worden bijvoorbeeld uit (beenmerg) stamcellen (dendritische cellen, macrofagen, MDSCs, mest cellen) of zullen direct na isolatie uit donormuizen (o.a. T cel subtypes zoals regulatoire T cellen en NKT cellen, B cellen, MDSCs, neutrofielen, monocytten) worden toegediend aan de acceptor muizen. We zullen gebruik maken van verschillende knock-out modellen (cytokine deficiënte muizen, muizen deficiënt in bepaalde voor atherosclerose interessante receptoren en andere moleculen) als donoren die al dan niet een vetrijk dieet toegediend hebben gekregen voordat de cellen geïsoleerd zullen worden uit verschillende organen (zoals beenmerg, milt, bloed, peritoneum en lymfeknopen). Ook zullen we cellen isoleren uit donormuizen, die behandeld zijn met bepaalde biologics of small molecules, zoals beschreven in bijlage 1.

In enkele specifieke gevallen (elk maximaal 5% van de experimenten) kan, naast de inductie van atherosclerose door het voeren met een westers type dieet, gekozen worden voor een van de hieronder gespecificeerde experimentele benaderingen (A, B):

A) Teneinde versneld atherosclerotische plaques te ontwikkelen in de halsslagaders, kan gebruik worden gemaakt van het zogeheten collarmodel te gebruiken. Dit model voor versnelde ontwikkeling van atherosclerotische plaques in de halsslagader van hyperlipidemische muizen (LDLr^{-/-}, LDLr^{-/-}/hApoB100^{tg} of apoE^{-/-} muizen) is binnen ons laboratorium ontwikkeld en beschreven door [REDACTED]. De plaques die op deze manier geïnduceerd worden vormen een relevant model voor humane plaques, aangezien de plaques op sterk vergelijkbare wijze zijn opgebouwd. Atherosclerotische plaques zullen versneld gevormd worden, waarbij na 4 weken gekeken wordt naar zogeheten plaque progressie, en na 6 weken naar vergevorderde plaques, afhankelijk van het doel van de proef. Dit model zal worden gebruikt om het therapeutisch effect te bepalen van de cellulaire therapie en met name om het effect van cellulaire therapie op plaque stabiliteit te meten.

B) Muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen zijn voornamelijk beschikbaar op een C57Bl6/wildtype achtergrond. Om atherosclerose te induceren in wildtype muizen (C57Bl6) kan er gebruik gemaakt worden van een adeno-associated virus dat codeert voor PCSK9 (mPCSK9-rAAV). PCSK9 is een enzym dat door binding aan de LDL receptor de afbraak van de LDL receptor in de lever versnelt. Middels een enkele injectie van het rAAV8-D377Y-mPCSK9 (GGO nr. IG-08013), wat codeert voor een gemuteerde vorm van het muis PCSK9 enzym (lever-specifiek), hebben wildtype muizen tot ten minste 80 dagen na injectie een verhoogde expressie van mutant PCSK9 in de lever. Dit resulteert in de downregulatie van de LDL receptor in de lever en dit leidt tot verhoogd plasma cholesterol waardoor wildtype muizen atherosclerose zullen ontwikkelen (Bjørklund et al. Circ Res. 2014;114:1684-1689, 2014). Deze methode wordt gebruikt om het mechanisme van bescherming geïnduceerd door de cellulaire therapie nader te onderzoeken.

De primaire uitkomstparameters van de modellen waarin we cellulaire therapie onderzoeken zijn:

- atherosclerose: de plaquegrootte in het hart, in de aorta en in de halsslagaders (in geval van collar plaatsing) wordt exact gekwantificeerd (in μm^2) en de plaque samenstelling wordt bepaald op parameters als aantallen en typen immuuncellen, collageengehalte en oppervlak van de necrotische kern.
- activatie status van immuuncellen in bloed, organen en lokaal in de plaque (expressie van bepaalde activatiemoleculen door de verschillende celtypen bepaald middels flow cytometrie)
- cholesterol en triglycerideniveaus in bloed
- cytokine niveau en expressie in bloed en weefsels

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

Voor de cellulaire therapie is de eerste stap het isoleren en opwerken van de donorcellen uit donormuizen:

- De muizen zullen worden geëthanaseerd door middel van cervicale dislocatie waarna het orgaan van interesse zal worden verwijderd. Cellen zullen dan op verschillende wijzen worden geïsoleerd uit de donororganen (beenmerg, milt, lymfeklieren) en/of *in vitro* worden gedifferentieerd in kweek door gebruik van groeihormonen en gemoduleerd alvorens ze worden toegediend aan de acceptormuizen. Cellen kunnen *in vitro* worden vermeerderd en kunnen beladen worden met een antigeen om een specifieke immuunrespons te bewerkstelligen.

Toediening van cellen:

- Intraveneuze injectie, maximaal 200 microliter per injectie, van donorcellen in een steriele zoutoplossing.
- Frequentie van de injecties (eenmalig tot wekelijks) is afhankelijk van het gebruikte celtype en de duur van het experiment.
- Hoeveelheid cellen die geïnjecteerd wordt is afhankelijk van het celtype.
- Muizen zullen afhankelijk van het experiment gedurende 4 tot 26 weken het vetrijke (hoog cholesterol) dieet krijgen om zo de verschillende stadia van atherosclerose te bestuderen. Cellen zullen afhankelijk van het celtype worden toegediend voor of na de start van het voeren van het westers type dieet.

Monster neming en analyses:

- Voor de analyse van immunologische (cytokine niveaus, witte bloedcel aantallen en status) en atherosclerotische parameters (lipiden niveaus) zal bloed afgenomen worden via de staartvene (elke 2 tot 4 weken, maximaal 100 microliter per bloedafname tot een maximum van 200 microliter per maand)

- Voor het volgen van de geïnjecteerde cellen in de acceptormuizen zullen in losse experimenten fluorescent gelabelde cellen gebruikt worden. Imaging zal plaats vinden onder de IVIS onder isofluoraan anesthesie. Een analyse onder de IVIS duurt maximaal 15 minuten, en de muizen zullen maximaal drie keer per week geanalyseerd worden.

Aan het einde van het experiment zullen voorafgaand aan het perfunderen van de weefsels de dieren een geschikte anesthesie toegediend krijgen, die voorkomt dat het dier ongemak zal ondervinden gedurende de perfusie met PBS. Na perfusie worden de weefsels van interesse en plasma/serum voor ex vivo/in vitro analyse naar het laboratorium gebracht voor verdere analyse.

Bij bepaalde experimenten zal naast het gebruik van westers type dieet om atherosclerose te induceren, gekozen worden voor een specifieke experimentele aanpak (A of B):

A) Collar-operatie:

- De muizen worden gedurende het gehele experiment op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden (vanaf 2 weken voor de operatie). Onder algehele adequate anesthesie zullen siliconen manchetten (zogenoeten collars) geplaatst worden rond beide halsslagaders van de hierboven beschreven muizen proximaal van de bifurcatie; na plaatsing zal de incisie gehecht worden met zijden hechtdraad en kunnen de muizen herstellen gedurende minimaal 24 uur waarbij de pijn verlicht zal worden door een subcutane injectie van buprenorphine (0.1 mg/kg). Deze aanpak zal worden gecombineerd met een cellulair therapie.

B) PCSK9-AAV:

De muizen zullen middels 1 intraveneuze injectie 5 tot 10 x10¹¹ genome copies rAAV8-D377Y-mPCSK9 ontvangen in een volume van 100 microliter. 0 tot 7 dagen na injectie van het PCSK9 virus zullen de muizen op een speciaal cholesterol-rijk dieet geplaatst worden ter bevordering van atherosclerose ontwikkeling. Muizen zullen afhankelijk per experiment gedurende 4 tot 26 weken op dit speciale cholesterol-rijke dieet blijven staan om verschillende stadia van atherosclerose te bestuderen.

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

In alle studies die wij zullen uitvoeren is de mate van atherosclerose (plaquegrootte) de belangrijkste uitleesparameter en dit blijkt ook de parameter met de grootste standaard afwijking (25%). Onderstaande parameters zijn gebaseerd op eigen jarenlang onderzoek en geven aan dat een groepsgrootte van 15 muizen gebruikt kan worden om betrouwbare statistische resultaten te verkrijgen.

Statistische parameters:

Onbetrouwbaarheidsdrempel 5%
 Onderscheidend vermogen 80%
 Coëfficiënt (tweezijdig toetsen) 21
 Verificatienorm 10%
 Meetbaar effect 35%
 Standaard afwijking 25%

Het aantal benodigde dieren (n) per groep volgens de formule $n = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha/2} - Z_p)(VC/100)m_1}{(m_1 - 100) \exp^2} \right]^2$ is: $2 \left[\frac{(1.96 - (-0.855))(25/100)135}{135 - 100} \exp^2} \right]^2 = 2 \left[\frac{(2.815 \times 0.25 \times 135)}{35} \exp^2} \right]^2 = 14.7$. Dit betekent 15 muizen per groep.

Experimenten bestaan doorgaans uit drie behandelde groepen, maar dit kan afhankelijk van de opzet van de individuele experimenten veranderen:

- Controle muizen die behandeld zullen worden met een zoutoplossing (0.9% NaCl of PBS)
- Muizen die behandeld worden met controle cellen (onbehandelde cellen, niet immuun-deficiënte cellen)
- Muizen die behandeld worden met de cellen van interesse.

Hierdoor omvat een gemiddeld cel-therapie experiment 45 acceptor muizen. Afhankelijk van het celtype dat uit de donoren wordt geïsoleerd varieert het aantal donormuizen. Dit wordt gebaseerd op eerdere experimenten en de bestaande literatuur. Indien mogelijk worden experimenten gecombineerd om het aantal controle groepen te reduceren.

B. De dieren

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

Muizen op een C57Bl6 achtergrond zijn verkregen via Jackson Laboratories of via samenwerking. Dit betreft LDLr-/-, LDLr-/-/hApoB100tg en apoE-/- muizen, en daarnaast muizen met een deficiëntie van het gen van interesse op een C57Bl6 of hyperlipidemische achtergrond, met bijbehorende controle muizen.

De voor deze proeven vereiste muizen zullen worden verkregen uit eigen fok in het [REDACTED] te Leiden.

Voor deze experimenten zullen we LDL receptor of ApoE deficiënte dieren als acceptormuizen gebruiken die op een Westers type dieet (0.25% cholesterol) atherosclerose ontwikkelen. Ook meer gehumaniseerde muizenstammen zullen worden gebruikt die humaan apoB100 tot overexpressie brengen in combinatie met humaan antigen presenterende moleculen (HLA-DR). Wij zullen voor ons onderzoek zowel mannelijke als vrouwelijke muizen gebruiken.

Per experiment, na overweging van de resultaten van eerdere experimenten, wordt bepaald welke groepen er nodig zullen zijn en hoeveel dieren er nodig zijn. Voor aanvang van de experimenten zullen protocollen geschreven worden, ter beoordeling van de IVD, die groepsgroottes bevatten bepaald op basis van jarenlange ervaring gecombineerd met statistische berekeningen (15 dieren per groep, zie bovenstaande statistiek). We zullen daarbij volwassen dieren gebruiken (8-12 weken oud).

Als donormuizen zullen we dezelfde soorten gebruiken of zullen we muizen deficiënt in bepaalde voor atherosclerose interessante receptoren en moleculen gebruiken. Deze muizen zullen ook worden verkregen uit de eigen fok of zijn afkomstig via samenwerkingsverbanden.

De te onderzoeken celtypen zijn: regulatoire T cellen, dendritische cellen, mesenchymale stamcellen, mestcellen, innate lymfoïede cellen, CD8 T cellen, myeloid-derived suppressor cells en regulatoire B cellen. Van een aantal van deze cellen hebben wij gerapporteerd dat ze beschermend kunnen werken tegen atherosclerose en op basis van deze primaire gegevens willen we de experimentele therapie verder optimaliseren (Cardiovasc Res. 2016 Aug 1;111(3):252-61; Sci Rep. 2015 Oct 22;5:15559; Cardiovasc Res. 2010 Feb 1;85(3):622-30). Daarnaast zullen ook tot op heden onbekende cellulaire subsets in het immuunsysteem onderzocht worden. De immunologie is een zeer dynamisch onderzoeksveld, waarin in de komende 5 jaar een naar verwachting aanzienlijk aantal nieuwe regulerende immuuncel subsets ontdekt zal worden. Wij verwachten daarom dat wij in 5 jaar ongeveer 40 experimenten zullen doen, van gemiddeld 3 groepen, wat neerkomt op 15 muizen per groep x 3 groepen = 45 muizen per experiment x 40 experimenten = maximaal 1800 muizen. Daarnaast zullen we naar verwachting 200 donormuizen gebruiken om cellen uit te isoleren. Dit komt op een totaal van 2000 muizen.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Om aan te tonen dat de genoemde celtherapie een effect heeft op de verschillende stadia van atherosclerose zijn in vivo modellen nog steeds noodzakelijk. Atherosclerose (en met name plaqueruptuur) is het pathologisch resultaat van een veranderde samenstelling van de vaatwand en een verstoorde communicatie tussen een groot aantal verschillende celtypen. De complexiteit van onderliggende mechanismen (ontsteking in de plaque en in de lymfoïde organen, apoptose, matrixremodelling), het onderlinge samenspel van de verschillende celtypen aanwezig in een atherosclerotische plaque en de bijdrage van componenten in de bloedsomloop aan de pathofysiologie impliceren dat in vitro studies (en met name single cell systemen), en daarmee vervanging van proefdieren, slechts op zeer beperkte schaal

mogelijk zijn.

Vervanging: Wij hebben human plaques beschikbaar waarin we de aanwezigheid van bepaalde immuuncellen kunnen aantonen, en met deze cellen kunnen cel-cel interacties in vitro worden getest. Waar mogelijk zullen ook in vitro experimenten worden gedaan in assays (zoals migratieassay met transwell systemen) gebaseerd op de volgende cellijnen: RAW264.7 cellen (muis macrofaag cellijn), H5V cellen (endotheel cellijn), gladde spiercellen en MC9/G8 cellen (muis mestcellijn). Atherosclerose is echter een complexe ziekte die tot stand komt door een combinatie van voeding, cholesterol homeostase in de lever en cholesterol afvoer via de gal, ontstekingsreacties in lymfoïde organen en de migratie van immuuncellen vanuit beenmerg en lymfoïde organen naar de plaques in de slagader. Effecten van door ons te onderzoeken stoffen die dit complexe proces beïnvloeden zijn daarom niet volledig te testen in uitsluitend *in vitro* modellen. Het blijft daarom noodzakelijk om het effect van experimentele geneesmiddelen op het complexe proces van atherosclerose te onderzoeken via *in vivo* experimenten.

Vermindering: Om atherosclerose-studies in muizen met een deficiëntie in immuun-gerelateerde genen uit te voeren moesten deze muizen tot op heden teruggekruist worden naar een LDL-receptor deficiënte achtergrond wat veel muizen en tijd kost. De rAAV8-D377Y-mPCSK9 vector zoals beschreven zal gebruikt worden om de ontwikkeling van atherosclerose in muizen op een C57Bl6 achtergrond te stimuleren als alternatief voor het terugkruisen op een LDLr deficiënte achtergrond en zo de hoeveelheid muizen nodig voor atherosclerose onderzoek aanzienlijk verminderen. Dit model zal alleen worden toegepast als het om een gen-deficiënte muis gaat, en zal niet worden toegepast voor interventiestudies.

Verfijning: het experimentele protocol is zodanig geoptimaliseerd, dat er met een minimaal aantal dieren volstaan kan worden: uit de ervaring van de divisie ██████████ op het gebied van hart- en vaatziekten is gebleken dat er een bepaald aantal dieren nodig is om in de vaatwand een meetbaar effect van een behandeling significant te kunnen waarnemen. Voor de optimale dosering van de cellulaire therapie zullen in vivo pilots uitgevoerd worden om het experimentele protocol verder te verfijnen.

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

Om angst bij de dieren tot een minimum te beperken zullen muizen niet alleen gehuisvest worden, maar altijd met meerdere muizen in aanwezigheid van kooiverrijking. Teneinde ongerief/pijn te verminderen zal direct na de microchirurgische handelingen gedurende minimaal 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buprenorphine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval). Mochten er langer kenmerken van pijn waarneembaar zijn wordt deze pijnbestrijding gecontinueerd zolang nodig. Daarnaast zullen muizen die met het PCSK9-AAV behandeld worden gehuisvest worden in de DM-II faciliteit, waarna bij verschonen het afval ter destructie wordt afgevoerd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Teneinde het ongerief te verminderen zal direct na de microchirurgische handelingen gedurende minimaal 24 uur pijnbestrijding worden toegepast middels een subcutane injectie van buprenorfine (100 µL, 0.1 mg/kg, 2 maal met 12 uur interval).

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er zijn geen andere vormen van welzijnsaantasting te verwachten door de celtherapie. Bij een eventuele collaroperatie kan de plaatsing van de ligatuur kan incidenteel het syndroom van Horner tot gevolg hebben door beschadiging van de perivasculaire sympathische zenuwen, waarbij partiele ptosis van het ooglid kan ontstaan. Het zicht wordt hierdoor matig belemmerd.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Collar: De plaatsing van het ligatuur kan incidenteel het syndroom van Horner tot gevolg hebben.

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

De muizen worden dagelijks gemonitord door de onderzoeker en de diervverzorgers en wanneer deze symptomen (syndroom van Horner) worden geconstateerd zal het desbetreffende dier worden geëuthanaseerd.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Een dier zal voortijdig worden geëuthanaseerd indien de volgende kwesties zich voordoen om het ongerief voor het betreffende dier te beperken:

- 15% gewichtsverlies in 2 dagen of 20% gewichtsverlies ten opzichte van het begin van het experiment. Het gewicht van de muizen zal daarom om de dag worden gemeten, vooral in de eerste dagen na een collar-operatie.
- Zichtbaar lijden (trillen/apathie/aanvallen door kooigenoten etc.)

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

Uit ervaring uit soortgelijke experimenten is gebleken dat <5% van de dieren deze criteria haalt in een celtherapie-experiment zonder chirurgische handelingen. In geval van het plaatsen van een collar zal maximaal 10% van de dieren een van deze criteria halen.

K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief zal afhankelijk van het experiment maximaal oplopen tot matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Om de mate van atherosclerose ontwikkeling te bepalen, en dus ook om te kijken of een bepaalde cellulaire therapie effectief is om een vermindering in atherosclerotische plaque ontwikkeling te verkrijgen, is het essentieel om aan het einde van het experiment het hart, de aorta en immuun gerelateerde organen (milt, lymfeknopen) te verkrijgen.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD106002017887
2. Titel van het project: Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuunmodulatie.
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 16-03-2017
 - aanvraag compleet: 20-03-2017
 - in vergadering besproken: 30-03-2017 & 18-05-2017
 - anderszins behandeld: via emailronde
 - termijnonderbreking(en) van 11-04-2017 t/m 08-05-2017 & 23-05-2017 t/m 29-05-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 08-05-2017 & 29-05-2017
 - advies aan CCD: 06-06-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD
8. Eventueel horen van aanvrager
N.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 11-04-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:
De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de achtergrond, het ontbreken van go/no-go momenten, de gekozen strategie, vermindering en het ongerief.
 - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages herschreven.
 - Datum: 23-05-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:
De DEC heeft naar aanleiding van de herschreven aanvraag bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot het ongerief en de humane eindpunten. Zij heeft tevens gevraagd een tabel met daarin de dieraantallen per

categorie, met specifieke dierkenmerken en het voor deze categorie te verwachten ongerief toe te voegen.

- Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages en de NTS naar tevredenheid door de aanvrager aangepast.

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

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 over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met 4B uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn niet uitkomstafhankelijk van elkaar maar zijn allemaal noodzakelijk om de hoofddoelstelling te behalen. De immunoreactie die ten grondslag ligt aan atherosclerose heeft vele aspecten en de processen dragen gezamenlijk bij aan de ontwikkeling en progressie van atherosclerose. Binnen de beschreven proefopzet worden drie therapeutische mogelijkheden onderzocht: (1) ingrijpen in de immunorespons ter behandeling van atherosclerose, (2) ontwikkelen van vaccins tegen atherosclerose en (3) ontwikkelen van een cellulaire therapie. Waar nodig zullen deze drie centrale therapievormen worden gecombineerd, omdat suppressie van het immuunsysteem een therapie kan vereisen die de interactie tussen immuuncellen via meerdere signalen beïnvloedt. De voorgestelde experimenten uit dit project zullen parallel aan elkaar worden uitgevoerd en de verzamelde kennis hieruit zal bijdragen aan meer inzicht in de relatie tussen de verschillende aspecten van het immuunsysteem en atherosclerose. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project is 3 ledig:
 - a) Het identificeren van specifieke ontstekingsgenen en ontstekingseiwitten in het proces van atherosclerose, die gebruikt kunnen worden als target voor de ontwikkeling van geneesmiddelen.

- b) Therapieën ontwikkelen om plaques te stabiliseren en om plaque regressie te realiseren door de bovenstaande geneesmiddel targets te remmen/stimuleren.
- c) Het ontwikkelen van een therapeutisch vaccin tegen atherosclerose gebaseerd op fundamenteel onderzoek naar de rol van het immuunsysteem in het proces van atherosclerose.

Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe immuuntherapieën die de vorming van atherosclerotische plaques tegengaat en mogelijk de bestaande plaques stabiliseren of zelfs verkleinen.

De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Het behandelen van hart- en vaatziekten met behulp van cholesterol verlagende geneesmiddelen zoals statines is de meest toegepaste behandelingsmethode voor atherosclerose echter statines verminderen het risico op het krijgen van cardiovasculaire complicaties slechts met ongeveer 30%. Dit betekent dat een zeer groot gedeelte van de hart- en vaatziekten patiënten geen baat heeft bij deze therapie en dat er een dringende noodzaak is om nieuwe therapeutische strategieën ontwikkelen. Er is hiervoor meer kennis nodig op het gebied van specifieke immunologische aangrijpingspunten en over mogelijke combinatietherapieën. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

- 5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het ontwikkelen van een immuuntherapie voor de behandeling van atherosclerose zijn de proefdieren, de onderzoekers, de patiënt en de maatschappij.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.
Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De wetenschappers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrière mogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.
Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Meer kennis over de initiatie, progressie en regressie van atherosclerose kan leiden tot preventieve of nieuwe behandelingsmethoden voor atherosclerose.
Waarden die voor de maatschappij bevorderd worden: nieuwe therapieën kunnen leiden tot een aanzienlijke reductie van de hoge kosten in de gezondheidszorg door medicijngebruik en operatief ingrijpen, maar ook door ziekteverzuim en arbeidsongeschiktheid.
- 6. Dieren die behandeld worden met een levende vaccin-vector worden in de DM-II faciliteit behandeld en gehuisvest teneinde eventuele verspreiding van dit micro-organisme en blootstelling van de onderzoeker tegen te gaan. Tevens worden de muizen die met het PCSK9-AAV behandeld worden gehuisvest in de DM-II faciliteit, waarna bij het verschonen het afval ter destructie wordt afgevoerd zodat het niet in het milieu terecht komt. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

- 7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. Het project bouwt verder op langlopend onderzoek dat wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep met een internationaal erkende expertise. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek met betrekking tot immuuntherapie voor atherosclerose. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald resulterend in een groot

aantal publicaties in internationaal gerenommeerde wetenschappelijke tijdschriften. Daarnaast zijn er belangrijke subsidies voor dit onderzoek binnen gehaald.

8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwefdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Naar inziens van de DEC ondervindt het merendeel van de muizen mild ongerief als gevolg van de injecties. Indien de muizen in combinatie met de injecties electroporatie, een collaroperatie of een beenmergtransplantatie ondergaan schat de DEC dat het cumulatief ongerief maximaal matig zal zijn. De muizen die gebruikt worden voor de cel isolatie worden zonder voorafgaande handelingen gedood. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het ongerief ingeschat door de onderzoekers.
12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren genetisch gemodificeerd zijn. Tevens zal er bij de meeste muizen atherosclerose geïnduceerd worden. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren minder natuurlijk gedrag kunnen vertonen.
13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. Het muismodel dat door een deficiëntie in specifieke genen gevoelig is voor atherosclerose vormt al jaren een zeer goed en gevalideerd diermodel voor atherosclerose. Plaque locatie en opbouw zijn sterk vergelijkbaar met de humane situatie. Van vele genen die geïdentificeerd zijn in humane genetische atherosclerose studies is de rol in de muis vergelijkbaar, wat de kracht van het muismodel onderschrijft. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Atherosclerose is het pathologisch resultaat van een

veranderde samenstelling van de vaatwand en een verstoorde communicatie tussen een groot aantal verschillende celtypen. Door de complexiteit van onderliggende mechanismen, het onderlinge samenspel van de verschillende celtypen aanwezig in een atherosclerotische plaque en de bijdrage van componenten in de bloedsomloop aan de pathofysiologie zijn *in vivo* modellen noodzakelijk. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.

15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. Alvorens experimenten met proefdieren worden ingezet zal in eerste instantie de werking van de immuun-modulerende stoffen, vaccins en desbetreffende cellen in *in vitro* systemen worden bevestigd en waar nodig geoptimaliseerd. Uitsluitend die therapeutica die in staat zijn om *in vitro* hun beoogde effect te bewerkstelligen, zullen gebruikt worden in atherosclerose experimenten. Naar inziens van de DEC zijn er geen echte go/no-go momenten, zij heeft er echter alle vertrouwen in dat er een goede afstemming zal plaatsvinden met de IvD, waardoor er geen onnodig onderzoek zal worden uitgevoerd. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Voor de experimenten wordt gebruik gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen.
19. Om te bepalen of behandeling met immuun-modulerende stoffen de mate van atherosclerose ontwikkeling vermindert en dus gebruikt kan worden als potentiële immunotherapie om hart- en vaatziekten te voorkomen of verminderen, is het essentieel om het hart, de aorta en immuun gerelateerde organen te verkrijgen voor analyse. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt (a) het identificeren van specifieke ontstekingsgenen en ontstekingseiwitten in het proces van atherosclerose, die gebruikt kunnen worden als target voor de ontwikkeling van geneesmiddelen, (b) het ontwikkelen van therapieën

om plaques te stabiliseren en om plaque regressie te realiseren door de bovenstaande geneesmiddel targets te remmen/stimuleren en (c) het ontwikkelen van een therapeutisch vaccin tegen atherosclerose gebaseerd op fundamenteel onderzoek naar de rol van het immuunsysteem in het proces van atherosclerose met als uiteindelijke doel het ontwikkelen van nieuwe immunotherapieën die de vorming van atherosclerotische plaques tegengaat en mogelijk de bestaande plaques stabiliseren of zelfs verkleinen het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?

2. Project gericht op het ontwikkelen van een immunotherapie voor de behandeling van atherosclerose.

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

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.

Waarden die voor de patiënten (incl. de maatschappij) bevorderd worden: groot voordeel.

De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.

Hart- en vaatziekten zijn één van de belangrijkste doodsoorzaken in de Westerse wereld en Nederland alleen al telt ruim 1 miljoen hart- en vaatpatiënten. Het proces van vernauwing van de slagaders, aderverkalking of atherosclerose, is de belangrijkste oorzaak voor het ontstaan van deze hart- en vaatziekten. In de loop der jaren is door een verbeterde behandeling van de acute gevolgen van hart- en vaatziekten het aantal acute sterfgevallen ten gevolge van hart- en vaatziekten sterk gedaald. Toch ondervinden nog steeds veel mensen grote nadelige gevolgen van hart- en vaatziekten, zoals pijn op de borst, problemen met het lopen en tijdelijk verminderde doorbloeding van de hersenen. Conventionele behandeling heeft echter een beperkt klinisch effect en kan het risico op cardiovasculaire complicaties met slechts 30% verminderen. Daarnaast wordt het succes van preventieve verwijdering van de plaque of van het aangedane bloedvatsegment in de praktijk verkleind door de geringe voorspelbaarheid. De DEC acht het ontrafelen van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van atherosclerose, en met name aan de rol van het immuunsysteem in dit proces van essentieel belang voor de ontwikkeling van nieuwe (preventieve) behandelingsmethoden voor atherosclerose. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren 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

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA LEIDEN



**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
AVD106002017887

Bijlagen

2

Datum 23 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 juni 2017. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD106002017887. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

23 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD106002017887

Datum:
23 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD106002017887

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10600
Naam instelling of organisatie: Universiteit Leiden
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 27 36 89 29
Straat en huisnummer: Rapenburg 70
Postbus: 9502
Postcode en plaats: 2300 RA LEIDEN
IBAN: NL78RAB00102468869
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Leiden 

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:



Datum:
23 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD106002017887

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:



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:
Geplande einddatum:
Titel project:

1 september 2017
31 augustus 2022
Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie

Titel niet-technische samenvatting:

Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie

Naam DEC:

DEC Leiden

Postadres DEC:

 LUMC, Postbus 9600, 2300 RC Leiden

E-mailadres DEC:



Betaalgegevens

De leges bedragen:
De leges voldoet u:

€ 1.541,-
na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

DEC-advies

Ondertekening

Naam: 
Functie: Gemandateerd vergunninghouder
Plaats: Leiden
Datum: 8 juni 2017

Datum:
23 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD106002017887



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA LEIDEN



**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
AVD106002017887

Bijlagen

2

Datum 23 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 23 juni 2017

Vervaldatum: 23 juli 2017

Factuurnummer: 170887

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD106002017887	€ 1.541,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA LEIDEN



**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
AVD106002017887

Datum 4 juli 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 23 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie" met aanvraagnummer AVD106002017887. 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

Kunt u een nieuwe NTS sturen, waarin u 'collar operatie' uitlegt of vervangt door andere woorden? Kunt u daarnaast 3.2 en 4.1 aanpassen zodat dit minder technisch wordt en begrijpelijk voor een leek?

Is voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 het aantal donordieren meegenomen in de aantallen? Zo niet, kunt u dit aanpassen in nieuwe Bijlagen Dierproeven?

Kunt u voor alle Bijlagen aangeven welke geslachten u wilt gebruiken en indien dit één geslacht betreft wetenschappelijk onderbouwen waarom? Als onvoldoende (wetenschappelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

Voor alle Bijlagen Dierproeven geeft u aan dat u diverse vervangingsmogelijkheden heeft. Kunt u in een nieuwe Bijlage Dierproeven

aangeven waarom deze in vitro methodes niet mogelijk zijn en in vivo onderzoek noodzakelijk is?

Datum:
4 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD106002017887

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. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. 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

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 11 juli 2017 12:40
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD106002017887

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

“De onderzoeker heeft in de tabel (05_AV106002017887_tabel) aangegeven dat het geslacht “unknown” is. De DEC heeft dit geïnterpreteerd als zijnde dat beide geslachten gebruikt zullen worden. Tevens is het zo dat wanneer in een projectaanvraag niet expliciet is aangegeven dat er uitsluitend mannelijke dan wel vrouwelijke dieren gebruikt worden, de DEC er van uit gaat dat er geen voorkeur is en dat beide geslachten (evenredig) gebruikt zullen worden”.

Met vriendelijke groet,

From: info@zbo-ccd.nl [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: dinsdag 4 juli 2017 13:13
To: [REDACTED]
Subject: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD106002017887

Geachte DEC Leiden,

Op 23-06-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie' met aanvraagnummer AVD106002017887.

In uw advies geeft u onder C18 aan dat beide geslachten gebruikt zullen worden. Echter, deze informatie staat niet in de Bijlagen Dierproeven beschreven. Hoe bent u tot de conclusie gekomen dat beide geslachten gebruikt zullen worden?

Daarnaast wil ik u aangeven dat de aanvrager de volgende vragen zijn gesteld. Mocht u hierop willen reageren, wilt u dit dan binnen 14 dagen doen?

Kunt u een nieuwe NTS sturen, waarin u 'collar operatie' uitlegt of vervangt door andere woorden? Kunt u daarnaast 3.2 en 4.1 aanpassen zodat dit minder technisch wordt en begrijpelijk voor een leek?

Is voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 het aantal donordieren meegenomen in de aantallen? Zo niet, kunt u dit aanpassen in nieuwe Bijlagen Dierproeven? Kunt u voor alle Bijlagen aangeven welke geslachten

u wilt gebruiken en indien dit   n geslacht betreft wetenschappelijk onderbouwen waarom? Als onvoldoende (wetenschappelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van   n geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

Voor alle Bijlagen Dierproeven geeft u aan dat u diverse vervangingsmogelijkheden heeft. Kunt u in een nieuwe Bijlage Dierproeven aangeven waarom deze in vitro methodes niet mogelijk zijn en in vivo onderzoek noodzakelijk is?

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,


Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



E-mail: [REDACTED]

[REDACTED], the Netherlands

Aan: CCD
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Telephone: [REDACTED]

Reference: JK

Leiden, 6-7-2017

Geachte leden van de CCD,

Hartelijk dank voor het in behandeling nemen van onze aanvraag. Middels deze brief willen wij graag de onduidelijkheden verhelderen. In onderstaande reactie hebben we de individuele punten verder uitgelegd, en we hebben betreffende zaken aangepast in de herziene CCD aanvraag.

Onduidelijkheden

1) Kunt u een nieuwe NTS sturen, waarin u 'collar operatie' uitlegt of vervangt door andere woorden? Kunt u daarnaast 3.2 en 4.1 aanpassen zodat dit minder technisch wordt en begrijpelijk voor een leek?

We hebben de NTS aangepast door de tekst in 3.2. en 4.1 minder technisch te formuleren. Ook hebben wij "collar operatie" vervangen door "het plaatsen van een siliconen bandje rond de halsslagader om atherosclerose te induceren".

2) Is voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 het aantal donordieren meegenomen in de aantallen? Zo niet, kunt u dit aanpassen in nieuwe Bijlagen Dierproeven?

Inderdaad waren de donoren nodig voor het uitvoeren van de beenmergtransplantatie-experimenten niet meegenomen in de berekening van het aantal dieren. Er zullen in totaal 78 donor muizen nodig zijn (42 muizen in bijlage 3.4.4.1 en 36 muizen in bijlage 3.4.4.2; deze dieren zullen gedood worden zonder interventie). We hebben dit in de betreffende bijlagen aangepast, waardoor het totaal aantal dieren in deze aanvraag op 5978 komt. Dit is ook aangepast in de NTS en in de bijgevoegde tabel.

3) Kunt u voor alle Bijlagen aangeven welke geslachten u wilt gebruiken en indien dit één geslacht betreft wetenschappelijk onderbouwen waarom? Als onvoldoende (wetenschappelijk) is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

Atherosclerose is een proces dat in zowel mannen als vrouwen voorkomt, en ook in muizen ontwikkelen zowel mannen als vrouwen atherosclerose. Uit eerdere studies weten we ook dat we onze experimenten in zowel mannen als vrouwen kunnen uitvoeren. Wij zullen daarom voor dit project zowel mannen als vrouwen gebruiken, en we zullen per experiment bepalen welk geslacht we zullen gebruiken. Beschikbaarheid van dieren uit speelt hierbij een rol om zo min mogelijk surplus

dieren te hebben. We hebben de volgende zin toegevoegd aan alle bijlagen van ons project: "Wij zullen voor ons onderzoek zowel mannelijke als vrouwelijke muizen gebruiken." (in B: de dieren).

4) Voor alle Bijlagen Dierproeven geeft u aan dat u diverse vervangingsmogelijkheden heeft. Kunt u in een nieuwe Bijlage Dierproeven aangeven waarom deze in vitro methodes niet mogelijk zijn en in vivo onderzoek noodzakelijk is?

We hebben in de drie bijlagen bij het deel "vervanging" de volgende tekst toegevoegd:

"Atherosclerose is echter een complexe ziekte die tot stand komt door een combinatie van voeding, lipiden synthese in de lever, ontstekingsreacties in lymfoïde organen en de migratie van immuuncellen naar de plaque in de slagader. Effecten van stoffen die dit complexe proces beïnvloeden zijn daarom niet afdoende te onderzoeken in *in vitro* modellen en dus blijft in vivo onderzoek noodzakelijk."

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.

Wij hebben de verschuldigde leges betaald op 28-6-2017 van rekening [REDACTED] op naam van ondergetekende.

Hoogachtend,

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden



Postbus 9502

2300 RA LEIDEN



**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

AVD106002017887

Datum 14 juli 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 23 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie" met aanvraagnummer AVD106002017887. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

In de NTS geeft u onder 3.5 aan dat 5% van de dieren 'geen ongerief' zal ondervinden. Deze dieren zullen zonder voorafgaande handeling worden gedood; dit valt onder 'licht ongerief'. Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin u het ongerief hebt aangepast?

Kunt u daarnaast een nieuwe tabel sturen waarin de donor-dieren ook zijn meegeteld?

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.

Wanneer een beslissing

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

Datum:

14 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD106002017887

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
namens deze:

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA LEIDEN



**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
AVD106002017887
Bijlagen
1

Datum 20 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 23 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie" met aanvraagnummer AVD106002017887. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6 en 19 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS, het aantal donordieren en het ongerief daarvan, de te gebruiken geslachten en de mogelijkheden tot vervanging.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 6 juni 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de

wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:
20 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD106002017887

Bezwaar

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



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 Leiden
Adres: Postbus 9502
Postcode en plaats: 2300 RA LEIDEN
Deelnemersnummer: 10600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Ontwikkeling van therapie tegen atherosclerose door middel van immuun modulatie" met aanvraagnummer AVD106002017887, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 6 juni 2017, ontvangen op 23 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 6 en 19 juli 2017

Aanvraagnummer:
AVD106002017887

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Effect van immunotherapie op atherosclerose				waarvan 42 donordieren
	Muizen (Mus musculus) /	2.142	20% Matig 80% Licht	
3.4.4.2 Vaccinatie tegen atherosclerose				waarvan 36 donordieren
	Muizen (Mus musculus) /	1.836	23% Matig 77% Licht	
3.4.4.3 Cellulaire therapie ter behandeling van atherosclerose				
	Muizen (Mus musculus) /	2.000	9% Matig 91% 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 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:

AVD106002017887

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:

AVD106002017887

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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