

Inventaris Wob-verzoek W21-06									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Projectaanvraag				x		x	x	
2	Projectvoorstel (versie 1)				x			x	
3	Bijlage dierproeven 1 (versie 1)				x			x	
4	Bijlage dierproeven 2 (versie 1)				x			x	
5	NTS (versie 1)			x					
6	Begeleidende e-mail bij ontvangstbevestiging, d.d. 18 september 2020				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging van projectaanvraag, d.d. 18 september 2020				x		x	x	
8	E-mail van CCD met kennisgeving adviesverzoek naar DEC, d.d. 18 september 2020				x		x	x	
9	DEC-advies, d.d. 22 oktober 2020				x			x	
10	Project proposal (versie 2)				x			x	
11	Bijlage dierproeven 1 (versie 2)				x			x	
12	Bijlage dierproeven 2 (versie 2)				x			x	
13	NTS (versie 2)			x					
14	E-mail met vragen aan vergunninghouder, d.d. 9 november 2020				x		x	x	
15	E-mail met reactie op vragen, d.d. 9 november 2020				x		x	x	
16	Antwoorden van vergunninghouder op vragen CCD				x			x	
17	NTS (versie 3)			x					
18	Begeleidende e-mail bij beschikking aan vergunninghouder, d.d. 23 november 2020				x		x	x	
19	Beschikking, d.d. 23 november 2020				x		x	x	
20	Gepubliceerde NTS	x							

25 SEP 2020



11004

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.zbo-ccd.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 10.2.g
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie 10.2.g
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde 10.2.e
		KvK-nummer 10.2.g
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer 10.2.g
		Postbus
		Postcode en plaats
		IBAN
		Tenaamstelling van het rekeningnummer
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters 10.2.e 10.2.e
		Functie
		Afdeling
		Telefoonnummer
		E-mailadres
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters 10.2.e
		Functie
		Afdeling
		Telefoonnummer
		E-mailadres

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum | 1 - 11 - 2020
- Einddatum | 1 - 11 - 2025
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The generation of new mouse models for fundamental and applied immunological research with human antibodies
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De generatie van nieuwe muismodellen voor fundamenteel en toegepast immunologisch onderzoek met humane antistoffen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC | 10.2.g
- Postadres | [Redacted]
- E-mailadres | [Redacted]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1662 Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Wijziging € Lege
- 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 10.2.e

Functie 10.2.e

Plaats 10.2.g

Datum 23-09-20

Handtekening 10.2.e



Form Project proposal

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2.g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

1.3 Provide the title of the project.

The generation of new mouse models for fundamental and applied immunological research with human antibodies

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

Basic research

Translational or applied research

Regulatory use or routine production

Research into environmental protection in the interest of human or

Research aimed at preserving the species subjected to procedures

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The ability to artificially introduce specific genetic modifications in mice by the use of embryonic stem cells or by zygote injection has made the production of human Abs in mice possible. Using these human Abs,

produced in mice for human therapy, prevents the initiation of an human immune response against mouse Abs (HAMA).

We have produced 2 different genetically modified (GM) mouse models that produce human antibodies. One model is producing 'classical' Abs: tetramers consisting of two heavy and two light chains (H2L2). The other GM mouse model is producing heavy chain only Ab (HCAbs) and lacking the light chains. H2L2 Ab are well known for their use in therapy. 10.2.g [REDACTED] for the production of human Abs. 10.2.g [REDACTED] removed.

Up till now, not all antigens gave satisfactory immune responses leading to therapeutic, diagnostic and/or human antibodies with the desired characteristics in our existing models. Therefore, we are trying to improve both GM mouse models by either making modifications to the transgenic antibody locus or other genes involved in the regulation of the immune response. For instance, by adding more DNA regions, coding for the variable parts of the Abs, we may increase number and diversity of the antibody repertoire upon immune response. 10.2.g [REDACTED]

[REDACTED] Specific human Abs will be obtained by immunizing the GM mice with an antigen. However, when this antigen is similar or identical to a mouse endogenous protein, the mouse will be tolerant and not produce Abs against the antigen. In contrast, the mouse will not be tolerant if the protein cannot be expressed due to adjustments made in the DNA. This strategy can only be applied if the protein is not essential for the mouse. In some cases, the antigen for immunization is not identical to the mouse endogenous protein, but difficult to produce *in vitro*. Then, with standard immunization, is not possible to obtain desired Abs. We can modify the DNA of the mice in such a way that 10.2.g [REDACTED]

Before using human Abs, produced by GM mice, they have to be extensively tested in preclinical research. If a GM mouse model does not exist for testing, it has to be generated, preferably with the same genetic background as the antibody producing GM mouse model.

By constantly trying to improve our existing GM mouse models or making new GM models, we make sure that the best suitable mouse model is used for any particular immunization or testing therapy. This will result in the reduction of animals and immunizations and will lead to an optimal result.

To obtain human antibodies from these new mouse models, mice have to be immunized. The immunization is part of another project license.

3.2 Purpose

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

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

The overall objective of this project proposal is the generation of new/improved GM models to obtain or to test human antibodies.

The first objective of this proposal is to improve our existing GM mice leading to the production of a broader repertoire of human Abs with excellent physiochemical properties for drug development and therapy. In addition, improving existing GM mouse models may lead to the production of therapeutic antibodies to more antigens.

The second objective of this proposal is to generate GM knock out mice for tolerant targets. When antigens are similar/identical to mouse endogenous proteins, mice are tolerant. Deleting the endogenous protein in mice prevents tolerance. This is possible for non-essential proteins only.

The third objective of this proposal is to generate GM mice expressing antigens that are difficult to produce *in vitro*. These antigens cannot result in an appropriate antibody response by standard immunization methods. The generation of the GM model will involve making double transgenic GM mice expressing a

10.2.g

The fourth objective of this proposal is the generation of GM models for pre-clinical testing of antibodies generated and tested initially *in vitro*.

The last objective is to isolate embryonic stem cells (ESCs) directly from our GM models. These ESC clones are validated for their ability to produce chimeras with germ line potential. The validated ESC clones form the starting material for further genetic engineering and the generation of new mice models. In addition, since our GM mouse models have multiple genetic alterations, these ESCs will serve as alternative back-up for calamities.

Our long-lasting experience and previous results show that the objectives of this project proposal are realistic and achievable.

3.3 Relevance

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

Immunizing the GM models is an efficient way to isolate fully human Abs with therapeutic/ diagnostic potential. For example, we recently obtained anti SARS CoV-2 Ab with virus neutralization capacity. This Ab will not only have a scientific relevance in studying the virus and choosing antigens for vaccine development but may have a huge social relevance in preventing people from getting ill, speeding up their recovery, reducing death rates and contributing to the recovery of collapsed economy worldwide. In addition, the human population in developed countries is characterized by a rapid increase in the incidence of age-related diseases such as cancer, Alzheimer's disease and heart diseases. Moreover, autoimmune disorders, antibiotic resistant bacterial infections and emerging zoonotic viruses are causing a threat for human population. The generation/improving of our GM models aims to facilitate fundamental and translational research that will ultimately lead to detection, prevention and curing of such diseases.

3.4 Research strategy

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

We have generated 2 GM mice models that produce antibodies with fully human variable regions. Such animals are used for immunization with therapeutically relevant antigens to isolate fully human antibodies for diagnostic and therapy. GM mice do not produce any endogenous mouse immunoglobulins (antibodies) due to deletion of endogenous loci in the mouse genome.

To improve the antibody production in general, DNA modification will be done : 1) To the transgenic constructs already present in the current GM models; 2) By alteration of other genes related to the immune response that might potentiate or reduce some effector functions (both objective 1). For some specific antigens that are difficult to produce *in vitro* and/or for which the conformation and cell surface expression is important modifications to the original GM model will consist of 3) introduction of the antigen as a transgene under the tetracycline-on system (objective 3). 4) For limited number of antigens for which the GM mouse model is tolerant since human and mouse protein are similar/identical, we will modify the GM model by 10.2.g

objective 2). 5) To test therapeutic Abs in the pre-clinical studies we will need to generate a specific GM mouse model (if such does not exist; objective 4).

When a line is to be used for multiple or difficult DNA modifications, *de novo* isolated and validated ESCs clones will be the preferably starting material for further modifications (objective 5).

For the proposed generation of GM models for fundamental and applied immunological research we will use three basic pathways:

The zygote pathway – This route is based on genetic engineering directly in fertilized oocytes (zygotes). A small amount of DNA, RNA and/or protein is injected into zygotes. The injected zygotes are surgically

implanted in the oviduct of a foster mother which brings the embryos to term, and weans the pups (founders). These litters are genotyped and founder mice with the correct modification(s) are kept.

The blastocyst pathway - This route is based on genetic engineering in cultured embryonic stem cells (ESCs) The genetically modified ESCs are injected into blastocysts, i.e. 3.5 day embryos. These injected blastocysts are surgically implanted in the uterus of a foster mouse. The foster mother brings the embryos to term suckles and weans the pups (founders). These founders are screened for contribution of the genetically modified ESCs based on coat-colour contribution or by genotyping using a strain specific quantitative real-time PCR. All chimeras are tested for germ line transmission.

For all pathways positive founders will be bred and maximal 5 mice of the newly established line will be killed for analysis.

The GEMM-Stem Cell pathway - The GEMM-Stem Cell (SC) pathway is a modified blastocyst route. Instead of using established wild type stem cell clones, new ESCs clones can be derived directly from existing genetically engineered mouse models. These GEMM-SC clones are validated for their ability to produce chimeras with germ line potential. The validated GEMM-SC clones form the starting material for further genetic engineering and mice are generated following the blastocyst pathway.

ESCs used in the blastocyst and GEMM-Stem Cell pathways are cultured on a feeder layer of primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs).

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

For the generation of GM mice and technology development we use the following groups of mice:

1. Donor female for isolation of oocytes, embryos or MEFs
2. Fertile stud male
3. Vasectomized stud male
4. Foster mother
5. Founders
6. F1 mice for analysis

In table 1, an overview is provided of which types of experimental mice are required for each part of the research strategy. The pool of vasectomized stud males is used from the cryopreservation/validation program running in the transgenesis unit to reduce the numbers of animals needed. Fertile studs will be reused for mating with the donor female and will not be used for animal experiments. The experimental procedures and accompanying expected discomfort are listed in table 2. The procedures performed on the mice are approved standard operating procedures (SOPs).

Table 1. Types of experimental mice required to generate GM mice

	Generation of GM mice			
	Zygote pathway	Blastocyst pathway	GEMM-SC derivation pathway	GEMM-SC validation pathway
1. Donor females	Yes	Yes	Yes	Yes
2. Fertile stud males	Yes	Yes	Yes	Yes
3. Vasectomized stud males*	Yes	Yes	No	Yes
4. Foster mothers	Yes	Yes	No	Yes
5. Founders	Yes	Yes	No	Yes
6. F1 mice for analysis	Yes	Yes	No	No

*) Vasectomized stud males will be used from the cryopreservation/rederivation program running in the facility.

Table 2. Types of procedures and level of discomfort

	Gender	Goal	Procedures	Discomfort
1. Donor females	F	Embryo isolation	Mate with fertile stud / Plug check / Cull mouse by cervical dislocation / Harvest embryos for blastocyst injections, ESCs isolation or MEFs isolation.	Mild
		Oocytes isolation	Superovulation (2 i.p. injections, SOP) / Cull mouse by cervical dislocation / Harvest oocytes	Moderate
2. Fertile stud male	M	Fertilization	Mate with female donor mouse (max. 3x per week, 4 months active)	None
3. Vasectomized stud male*	M	Mock fertilization	Mate with foster mother	None
4. Foster mother	F	Oocyte or embryo implantation	Mate with infertile stud male / Plug check next day / Surgical embryo implantation under injection anesthesia and pain relief (SOP) / Birth of GM pups / Wean litter / Cull mouse	Moderate
5. Founders	M & F	Identification, DNA extraction and analysis	Distal phalanx clipping of mouse at 4-5 days after birth (SOP) for identifying and genotyping..	≤ mild
6. F1 mice for analysis	M & F	Analysis of phenotype	Cull mouse by cervical dislocation/ Isolate tissues for analysis	Mild

*) Infertile stud males will be used from the cryopreservation/rederivation program running in the facility.

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

The objective of this project proposal is the generate new/improved GM models to obtain or to test human antibodies (originated from our GM models). The choice of the transgenesis pathway depends on the type of DNA modifications to be made. For instance, if a lot of subsequent modifications have to be made to the GM model, the GEMM-Stem Cell pathway (and thus also the derivation of new ESCs clones) will be the obvious choice. Generating a simple deletion using CRISPR/Cas will most likely follow the zygote route. Choices of the pathway will depend on numbers of mice involved (keeping numbers to minimum) and the chance of success in modifying the genome.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Generation of GM mice, ESC derivation/validation.
2	ESC-MEF-derivation
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2.g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Generation of GM mice, ESC derivation/validation.

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Three basic pathways currently exist for the generation of GEMMs:

The zygote pathway – This route is based on genetic engineering directly in fertilized oocytes (zygotes). A small amount of DNA, RNA and/or protein is injected into zygotes. The injected zygotes are surgically implanted in the oviduct of a foster mother. This foster mother brings the embryos to term, suckles, and weans the pups (founders). These founders are genotyped. Founder mice with the correct modification(s) will be bred to establish a GM line. Maximal 5 F1 mice/new line will be killed for analysis.

The blastocyst pathway - This route is based on genetic engineering in cultured embryonic stem cells (ESCs). The genetically modified stem cells are injected in blastocysts, i.e. 3.5 day embryos. These injected blastocysts are surgically implanted in the uterus of a foster mouse. The foster mother brings the embryos to term suckles and weans the pups (founders). These founders are screened for contribution of the genetically modified stem cells based on coat-color contribution or by genotyping using a strain specific quantitative real-time PCR. Chimeras are delivered bred for germline transmission and to establish a GM line. Maximal 5 F1 mice/new line will be killed for analysis.

The GEMM-Stem Cell pathway - The GEMM-Stem Cell (SC) pathway is a modified blastocyst route. Instead of using established wild type stem cell clones, new ESCs be derived directly from existing genetically engineered mouse models. These GEMM-SC clones are validated for their ability to produce chimeras with

germ line potential. The validated GEMM-SC clones form the starting material for further genetic engineering and mice are generated following the blastocyst pathway.

To minimize backcrossing new GM mouse models will preferably be generated directly on the desired strain or GM mouse model leading to a reduction of mice needed for breeding. In addition, with the latest technological advances in transgenesis, such as CRISPR/Cas9 gene editing and improved ESC culture conditions, multiple genetic modifications can often be introduced in the same experiment. This prevents the need for intercrossing of GEMMs to obtain the desired set of genetically modified alleles and again leading to a reduction in mice.

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

For the generation of new GM mice we use the following groups of mice:

1. donor mice
2. fertile stud males
3. Vasectomized stud males
4. foster mothers
5. Founders
6. F1 mice for analysis

The procedures for each different type of mouse is described in table 1.

Table 1 Types of procedures and level of discomfort

	Gender	Goal	Procedures	Discomfort
1. Donor females	F	Embryo isolation	Mate with fertile stud / Plug check / Cull mouse by cervical dislocation / Harvest embryos, i.e. zygotes, morulae or blastocysts	Mild
		Oocytes isolation	Superovulation (2 i.p. injections, SOP) / Cull mouse by cervical dislocation / Harvest oocytes	Moderate
2. Fertile stud male	M	Fertilization	Mate with female donor mouse (max. 3x per week, 4 months active)	None
3. Vasectomized stud male*	M	Mock fertilization	Mate with foster mother	None
4. Foster mother	F	Oocyte or embryo implantation	Mate with infertile stud male / Plug check next day / Surgical embryo implantation under injection anesthesia and pain relief (SOP) / Birth of GM pups / Wean litter / Cull mouse	Moderate
5. Founders	M & F	Identification DNA extraction and analysis	Distal phalanx clipping of mouse at 4-5 days after birth (SOP) for identifying and genotyping.	≤ mild
6. F1 mice for analysis	M & F	Analysis of phenotype	Cull mouse by cervical dislocation/ Isolate tissues for analysis	Mild

*) Vasectomized stud males will be used from the cryopreservation/rederivation program running in the facility.

Four procedures involve treatment of the mice: 1) superovulation, 2) implantation 3) vasectomy and 4) distal phalanx clipping or clipping of the ear.

Superovulation: ≥ 5 week old female mice receive 2 i.p hormone treatments, 48h apart. Based on our experience, superovulation at this age results in a maximum number of fertilized oocytes of good quality for most laboratory mouse strains. Superovulation of older mice dramatically reduces the number of

oocytes. After the last treatment, the female mouse is mated with a stud male. Next day a plug check is performed. Plugged females will be collected and set aside till usage. All female mice are culled 3.5 days post mating and embryos are isolated. SOPs apply.

Implantation: Two types of implantations are performed. 1) oocyte/2-cell implantation in the oviduct of a foster mother. 2) blastocyst implantation in the uterus of a foster mother. Surgery is performed on 8-16 week old plugged female mouse (weight 18-30g) following SOP and takes on average 20 minutes per mouse.

In brief, a 1 cm incision is made parallel to the dorsal midline to expose the oviduct and uterus.

For the oocyte/2 cell implantation: The infundibulum is located and using a fine glass capillary pipet 20-25 oocytes/2-cell embryos are inserted into the oviduct.

For the blastocyst implantation: With a syringe a small hole is made in the uterus wall. With a small glass capillary pipet 8-10 blastocysts are inserted through the hole into the uterus.

Next the oviduct-uterus is placed back in the abdomen and the peritoneum is closed with 1-2 sutures.

Wound clamps are used to close the skin, which are removed 8-10 days after the operation. Mice are anesthetized and post operation pain relief is administered

Distal phalanx clipping: Distal phalanx clipping of mouse at 4-5 days after birth following SOPs for identifying and genotyping.

Founder mice of interest are used for breeding and for the initial welfare assessment. If the founder shows a phenotype with discomfort, it will not be bred further.

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

Statistical methods are less applicable to these activities. We use state-of-the-art technology for the generation of GM mice. We constantly monitor our achieved efficiencies and success rates, and optimize procedures where needed, thereby minimizing the number of animals.

B. The animals

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

Mus musculus: GM and normal mice from regular laboratory strains and crossings with a maximal age of 240 days. All mice will be bred in our own institute or are coming from registered commercial breeders or nVWA approved institutions.

Our own experience over the last 20 years and those of others show that for the generation of GM mice on average 150 mice are needed. (30 donor mice, 20 foster mothers and 100 pups). The vasectomized males needed for the generation of pseudo pregnant foster mothers will be used from the cryopreservation/rederivation program running in the transgenesis unit. Fertile studs are only used for mating with the donor females.

We will only generate GM mice if their use is described in a project license.

Based on experience, we expect to generate maximal 10 lines per year. In the coming 5 years this will be maximal 50 lines. Some of those will be generated using de novo isolated ESCs (Appendix 2).

For testing newly generated GM lined we need maximal 5 F1 mice/line. For 50 new lines, in a period of 5 years, the maximal number will be 250 mice.

Therefore we expect to use maximal 2750 mice to generate and analyze new GM mice the next 5 years.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

1- To reduce the number of mice used, the transgenic facility is using the vasectomized males from the cryopreservation/rederivation program also for generating pseudo pregnant foster mothers to generate GM mouse models. In this way we need less vasectomized males in total. Similarly, the colony of mice used for the generation of pseudo pregnant foster mice is shared between the cryopreservation, rederivation and GM mouse model generation programs. Again, leading to a reduction of mice being used.

2- If possible oocyte GM oocyte donors (and GM stud males) will be used to generate a GM line. In this way multiple rounds of breeding to obtain compound transgenic background will be avoided; saving on mice used. When numerous genome changes have to be made, this will be preferable done in ESCs. In this way multiple round of injections can be prevented: saving on mice used.

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

- 1) All surgical procedures (i.e. oocyte/embryo transfer into foster mothers) will be done using adequate anesthesia and analgesia. All techniques described used will be performed by experienced personnel.
- 2) To reduce discomfort because of the size difference between oocyte donor females and stud males, the minimal age of the female donor mice will be approximately 5 weeks. In contrast to older (mature) females, superovulation at this age will still produce a high number of oocytes of sufficient quality.
- 3) Whenever possible, mice will be housed socially and cage enrichment will be provided.
- 4) GM mice may not be entering the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Mice will be housed in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU if possible. However, after males have mated, they often show aggressive behaviour towards each others when housed socially. To avoid fighting and stress of these males, they will be kept individually for those periods they are not used as breeding partner.

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Surgical procedures will be carried out aseptically under adequate anaesthesia and combined with peri-operative analgesia (long-acting). This procedure is subjected to change when new concepts or ideas about optimal anaesthesia/analgesia evolve.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In many cases it is difficult to predict the effect of a genetic modification. Based on our experience, in the vast majority (>99%) the GM founders do not show discomfort.

Explain why these effects may emerge.

We do not expect adverse effects.

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

Cage enrichment will be provided. The health will be daily checked by experienced personnel.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Discomfort:

Mice will be killed if:

1. birth defects affecting vitality occur
2. severe complications due to surgical procedures (bleedings, infections) occur
3. the mouse has severe wounds (for example due to fighting)
4. the mouse stops eating and/or drinking (loss of body weight, dehydration)
5. mild circulation and/or breathing problems occur
6. behavioral problems occur

Indicate the likely incidence.

We expect the incidence to be very low (less than 1%)

K. Classification of severity of procedures

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

Generation of lines:

Mouse	treatment	Discomfort	Number
Donor mice :	superovulation:	moderate 100%	600 mice
	natural mating:	mild 100%	900 mice
Foster mothers:	implantation:	moderate 100%	1000 mice
Offspring/founders:		none >>99%,	5000 mice ¹
F1 mice for analysis:		mild	250

¹) not animal experiments

Animals in experiments:

Severity	#	%
Non-recovery	-	0
Mild	1150	42
Moderate	1600	58
Severe	-	0
Total	See question B	100%

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

1. Donors mice are killed to collect the oocytes/embryos.
2. Fertile stud males are killed at the maximum age of 240 days or earlier if the libido has decreased. After this age their libido is diminished and they are not suitable anymore
3. Infertile stud males – Male mice are killed at the maximum age of 240 days or earlier if the libido has decreased. After this age their libido is diminished and they are not suitable anymore
4. Foster mothers are killed after weaning of the pups. Optional they are used for health status screening.
5. Founders will be killed after breeding.
6. F1 GM will be killed for analysis.

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

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

X Yes



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2.g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
2	Timed pregnancies

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In this project proposal we want to isolate and validate *de novo* embryonic stem cells (ESCs) from our mouse models. These ESCs can form the starting material for further complex genetic engineering and the generation of new mice models. In addition these ESCs clones serve as alternative back-up for calamities. Timed pregnancies are needed to derive *de novo* ESCs lines. Successful culturing of ECSs depends on the quality of feeder cells, since they secrete the extracellular matrix that directly affects the growth of ESCs. Primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) function as feeder cells to maintain mouse ESCs in an undifferentiated state. For *de novo* ECSs establishment we need blastocyst stage mouse embryos. For generation of MEFs we need mouse E11-15 embryos. Timing of the pregnancy can done by checking copulation plugs.

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

Female mice will be put with the stud mice. Next morning females will be checked for the presence of copulation plugs. Plugged females are collected and put in a separate cage until used. For ESCs derivation plugged females will be killed at day E3.5. Blastocyst will be isolated and put in culture to derive ESCs. For primary MEFs cultures plugged females will be killed at E11-15. Embryos will be isolated and put in culture to obtain MEFs.

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

Statistics are not directly applicable. Plugs are checked by trained personnel. In this way chances on wasting mice are reduced. Primary MEFs can be frozen for future usage preventing the repeated pluggings and isolations. We will not generate ESCs clones from all newly generated mice, but only from those that have potential to be further modified in vitro (estimate 1 out of 10 newly generated lines). The rest of the lines will be frozen as embryo's (multiple homozygous) or by sperm cryopreservation

B. The animals

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

Mus musculus, GM or normal mice, females 8-180 weeks of age. 'For ESCs derivation, we use our GM (homozygous). On average 4-5 blastocyst are isolated from a plugged female. 1 in 20-25 cultures will yield an usable ESCs clone, i.e. correct karyotype, undifferentiated state etc. For safe cryopreservation and future modifications, we need at least 2 independent ESCs clones. With these numbers we can derive and store 1-2 new ESCs lines per year (Approximately 150 plugged females). To derive the MEFs, necessary for deriving and culturing the ESCs clones, we need about 10 plugged normal female mice per year, 50 in 5 years.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

De novo ESCs are used when numerous genome changes have to be made. In this way multiple round of injections, using numerous mice can be prevented. Modifications to the genome can be checked in the ESCs. This saves on the number of mice used for analysis of the modification.

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

Mice will be housed socially (i.e. female mice with the same plug date are housed together). Cage enrichment will be provided.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

X No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

No adverse effects on animals' welfare is expected.

Explain why these effects may emerge.

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

Cage enrichment will be provided. The health will be daily checked by experienced personnel.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Discomfort:

Mice will be killed if:

1. the mouse has severe wounds (for example due to fighting)
2. the mouse stops eating and/or drinking (loss of body weight, dehydration)
3. mild circulation and/or breathing problems occur
4. behavioral problems occur

Indicate the likely incidence.

<<1%

K. Classification of severity of procedures

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

Embryo donor mice:

Severity	#	%
Non-recovery	-	0
Mild	200	100
Moderate		0
Severe	-	0
Total	See question B	100%

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Donor mice will be killed by cervical dislocation for the purpose of collecting embryos as a source of ESCs or primary MEFs.

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

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

X Yes



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project De generatie van nieuwe muismodellen voor fundamenteel en toegepast immunologisch onderzoek met humane antistoffen
- 1.2 Looptijd van het project 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) Transgeen, modificatie, muismodel, inductie, antistoffen

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Genetisch Gemodificeerde muizen (GM muizen) kunnen door het aanpassen van de genetische code menselijke antistoffen maken. Deze kunnen worden gebruikt in strijd tegen diverse ziektes bij mensen. We hebben muizenmodellen ontwikkeld die menselijke antistoffen kunnen produceren. We proberen deze muizenmodellen steeds te verbeteren zodat tegen meer antigenen betere antistoffen gemaakt kunnen worden. De menselijke antistoffen worden verkregen door GM muizen te immuniseren met specifieke antigenen. Lijkt het antigen te veel op een eiwit van de muis zelf dan is de muis

tolerant en zal geen antistof maken tegen het antigen. De tolerantie kan worden voorkomen door het DNA van de muis aan te passen zodat het eiwit niet meer wordt gemaakt. In sommige gevallen is het maken van een antigen in een reageerbuis niet mogelijk, maar alleen in de muis zelf. Om toch menselijke antistoffen tegen deze antigenen te verkrijgen willen we het DNA van de GM muis veranderen zodat deze het antigen op een bepaald moment gaat maken. Doordat de muis dit antigen nog nooit 'gezien' heeft zal het menselijke antistoffen gaan maken.

Embryonale stamcellen geïsoleerd uit onze muismodellen kunnen we gebruiken voor verdere (ingewikkelde) aanpassingen van DNA in celkweek. Cellen met de juiste aanpassingen kunnen worden gebruikt voor de generatie van nieuwe muizenlijnen. Ook gebruiken we deze cellen als een back-up van de muizenlijnen.

Voordat de humane antistoffen geproduceerd door muizen gebruikt kunnen worden voor therapie bij de mens moeten ze uitvoerig worden getest in preklinisch onderzoek. Als hiervoor geen GM-muismodel bestaat zal het moeten worden gegenereerd. Dit test-muisenmodel heeft bij voorkeur dezelfde GM achtergrond als de antistof producerende GM muis, zodat afweerreacties tegen de humane antistof achterwege blijven.

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

We willen voor elk medisch relevant antigen humane antistoffen met therapeutische en/of diagnostische waarden produceren. Dit willen we bereiken de bestaande muizenlijnen aan te passen, afhankelijk van het antigen. Als een muizenmodel voor het pre-klinisch testen van verkregen humane antistoffen niet bestaat willen we deze maken.

Voor het preklinisch testen van humane antistoffen willen we GM muizen maken. Deze veranderingen, waardoor ziektes worden nagebootst, zullen resulteren in modellen voor onderzoek naar potentiële therapieën.

Onze muizenmodellen hebben al enkele, wetenschappelijk erg interessante humane antistoffen geproduceerd, die van groot belang kunnen zijn voor de samenleving.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Mus musculus (muis), maximaal 2950

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

Een gedeelte van de muizen ondervindt matig ongerief door hormooninjecties. Een ander gedeelte van de muizen ondervindt matig ongerief door een chirurgische ingreep. Hierbij worden de dieren onder narcose worden gebracht. Voor na de operatie krijgen de dieren pijnstilling.

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

20% van de muizen heeft maximaal matig ongerief door hormooninjecties of een chirurgische ingreep. 17,5 % van de muizen heeft maximaal licht ongerief omdat ze worden gedood voor de isolatie van vroege embryo's, embryonale stamcellen (ESCs) of embryonale fibroblasten (MEFs).

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De muizen met de beoogde genetische wijziging worden gekruist voor het genereren van het nieuwe GM muismodel. De muizen zonder genetische wijziging en/of die niet geschikt zijn voor het onderzoek worden gedood. De muizen die gebruikt worden voor het verkrijgen van ESCs en MEFs zullen worden gedood.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

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

Voor het ontwikkelen van humane antistoffen is het gebruik van genetisch gemodificeerde muizen noodzakelijk. Het ontwikkelen van selecteren van hoogwaardige antistoffen is nog niet mogelijk in een reageerbuis. Het enige alternatief voor het produceren van volledig menselijk antilichaam is isolatie uit het menselijke bloed. Dit is mogelijk voor sommige infectieziekten, maar niet mogelijk of niet effectief voor andere doelen.

4.2 **Vermindering**

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

De generatie van GM muizenmodellen is een specialistische procedure. Hiervoor hebben wij een goed uitgeruste transgene faciliteit, waar uitgebreide ervaring voorhanden is. Binnen de transgene faciliteit worden nieuwe ontwikkelingen, die leiden tot een vermindering van het aantal proefdieren gevolgd, getest en waar mogelijk toegepast. Ingewikkelde genetische veranderingen, waarbij veel dieren nodig zijn, kunnen worden gedaan in ESCs, buiten het dier. De gevasectomeerde mannetjesmuizen nodig voor het cryopreservatie programma van de faciliteit worden ook gebruikt voor de generatie van GM muizen.

4.3 **Verfijning**

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

De muis is zeer geschikt als proefdier omdat deze relatief eenvoudig te huisvesten is, een korte generatietijd heeft en grote nesten geeft. Bovendien is de muis genetisch goed gekarakteriseerd en vertoont fysiologisch veel overeenkomsten met de mens.

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

De handelingen voor het genereren van nieuwe GM muismodellen en de dagelijkse controle van de betrokken muizen worden uitgevoerd door ervaren gekwalificeerd personeel. Waar nodig worden handelingen binnen deze dierproeven uitgevoerd onder narcose met pijnstilling. Indien de mate van ongerief hoger is dan vooraf ingeschat wordt de muis gedood. De muizen

worden sociaal gehuisvest tenzij dit niet mogelijk is. Kooiverrijking voorziet in de behoeften van de muizen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Van: Info-zbo
Aan: 10.2.g 10.2.e
Cc: 10.2.e
Onderwerp: AVD10.2.g 02011004
Datum: vrijdag 18 september 2020 10:08:23
Bijlagen: OntvangstBevestiging.pdf

Geachte 10.2.e

In de bijlage treft u de ontvangstbevestiging van uw **aanvraag AVD 10.2.g 202011004** aan, waarnaar wij gemakshalve naar verwijzen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.e, 10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD **10.2.g** 202011004
Bijlagen
2

Datum 18 september 2020
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte **10.2.e**

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 september 2020. Het gaat om uw project "The generation of new mouse models for fundamentall and applied immunological research with human antibodies". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD **10.2.g** 202011004. 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, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.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:

18 september 2020

Aanvraagnummer:

AVC10.2.9 202011004



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:

Naam instelling of organisatie:

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

Straat en huisnummer:

Postbus:

Postcode en plaats:

10.2.e, 10.2.g

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

10.2.e, 10.2.g

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

10.2.e, 10.2.g

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag

Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve
gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve
gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 november 2020
Geplande einddatum: 1 november 2025
Titel project: The generation of new mouse models for fundamentall and applied immunological research with human antibodies
Titel niet-technische samenvatting: De generatie van nieuwe muismodellen voor fundamenteel en toegepast immulogisch onderzoek met humane antistoffen.
Naam DEC: **10.2.g**
Postadres DEC: **10.2.g**
E-mailadres DEC: **10.2.g**

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.662,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: **10.2.e**
Functie: **10.2.e**
Plaats: **10.2.g**
Datum: 18 september 2020



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.e en 10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD10.2.g 202011004
Bijlagen
2

Datum 18 september 2020
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 18 september 2020

Vervaldatum: 18 oktober 2020

Factuurnummer: 2011004

Ordernummer: inkoopordernr 10.2.g

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10.2.g 202011004	€ 1.662,00

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.

Van: info@zbo-ccd.nl
Aan: 10.2.g 10.2.e
Cc: 10.2.e
Onderwerp: Verzoek om advies AVD 10.2.g 202011004 verstuurd aan DEC
Datum: vrijdag 18 september 2020 10:09:54

Geachte meneer, mevrouw,

Op 18-09-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The generation of new mouse models for fundamentall and applied immunological research with human antibodies" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202011004.

Uw aanvraag is naar 10.2.g gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD **10.2.g** 202011004
 2. Titel van het project: The generation of new mouse models for fundamental and applied immunological research with human antibodies.
 3. Titel van de NTS: De generatie van nieuwe muismodellen voor fundamenteel en toegepast immunologisch onderzoek met humane antistoffen
 4. Type aanvraag:
 - X nieuwe aanvraag projectvergunning
 5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **10.2.g**
 - telefoonnummer contactpersoon: **10.2.g**
 - E-mailadres contactpersoon: **10.2.g**
 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 11-09-2020 (verzoek advies CCD 18-09-2020)
 - aanvraag compleet: 16-10-2020
 - in vergadering besproken: 21-09-2020
 - anderszins behandeld: schriftelijke ronde per e-mail: nvt
 - termijnonderbreking(en) (van/tot): van 22-09-2020 tot 12-10-2020
 - van 14-10-2020 tot 16-10-2020
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen n.v.t.
 - aanpassing aanvraag: 12-10-2020 en 16-10-2020
 - advies aan CCD: advies aan CCD en aanvrager gestuurd 22-10-2020
 7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
 - De aanvraag is afgestemd met de IvD van de aanvrager en heeft de instemming van de IvD
- Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.*
8. Eventueel horen van aanvrager.
 - n.v.t.
 9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum vragen: 22-09-2020
 - Gestelde vragen en opmerkingen betroffen de volgende onderwerpen:
 - Voor inzicht in context van experimenten in dit project refereren naar eerder meer toepassingsgericht project

14 juli 2016

- Beschrijving van 2 typen donoren
 - Aansluiting van beschrijving van het belang bij de doelstellingen
 - Voorwaarden voor het gaan genereren van een nieuwe lijn
 - Toelichten van de analyse op de F1 muizen
 - Is eerste immunisatie onderdeel van fenotypering?
 - Beschrijving/berekening/onderbouwing van aantallen dieren
 - Toelichten van '*validatie van de novo embryonale stamcellen*'
 - NTS: Context/toepassingsgebied
 - NTS: Weergave verschillende groepen dieren
- Datum antwoord: 12-10-2020
 - Datum vragen: 14-10-2020 (telefonische terugkoppeling)
 - Gestelde vraag naar aanleiding van antwoord en bijstelling appendix in vorige vragenronde:
 - Afbakening van dit project met het project waarin de onder dit project genereerde muizen worden gebruikt voor immunisaties
 - Datum antwoord: 16-10-2020

Alle vragen zijn naar tevredenheid van de commissie beantwoord en verwerkt in de aanvraag.

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

- n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).
Het project is een generieke aanvraag voor het genereren van genetisch gemodificeerde muizen waarin alle endogene genen die noodzakelijk zijn voor het produceren van muizen antilichamen zijn verwijderd en vervangen door genen voor de productie van humane antilichamen. Deze muizen worden gebruikt voor de productie van humane antilichamen uiteindelijk voor toepassing in de kliniek voor

therapie en diagnose. Deze productie-experimenten zullen in aparte projecten worden aangevraagd. Er zullen onder dit project pas genetisch gemodificeerde muizen worden gemaakt als deze muizen en de immunisaties waarin ze gebruikt worden in andere projecten zijn vergund en de betreffende experimenten onder die projecten nog beschikbaar zijn.

Het aanbrengen van nieuwe genetische modificaties in de genen die betrokken zijn bij de productie van antilichamen biedt de mogelijkheid om voor elk antigeen waar antilichamen tegen geproduceerd gaan worden het beste model te creëren. Bijvoorbeeld door modificaties coderend voor het variabele gedeelte van de antilichamen aan te brengen kan het repertoire van de antilichamen worden vergroot. Door deleties in genen betrokken bij de regulatie zou de immuunrespons kunnen worden verhoogd.

Voor antigenen die moeilijk in voldoende hoeveelheden te produceren zijn worden in muizen die al humane antilichamen produceren induceerbare genetische modificaties aangebracht waarmee de muis na het aanzetten van dit gen het antigeen waarvoor dit codeert zelf gaat produceren en vervolgens daartegen antilichamen gaat maken.

Het project bevat drie strategieën voor het maken van genetisch gemodificeerde modellen, die afhankelijk van de aard van de modificatie kunnen worden toegepast: het aanbrengen van de genetische modificatie direct in bevruchte oocyten (zygoten), en twee strategieën waarbij de genetische modificatie aangebracht wordt in embryonale stamcellen die vervolgens geïnjecteerd worden in blastocysten. Hierbij wordt of uitgegaan van gekweekte embryonale stamcellen of van embryonale stamcelklonen uit reeds genetisch gemodificeerde muizen.

Voor de kweek van deze embryonale stamcellen zijn feeder-cellen nodig (primaire embryonale fibroblasten) die geïsoleerd worden uit E11-E15 muizen embryo's. De samenhang tussen de experimenten is voldoende onderbouwd. Deze sluiten logisch aan bij de directe en uiteindelijke doelstellingen.

De indiener heeft jarenlange ervaring met het genereren van dit soort muizenmodellen en het hiermee produceren van humane antilichamen voor therapie en diagnose.

De afbakening van de handelingen onder dit project en de handelingen onder de vervolprojecten (met name met betrekking tot de fenotyperingen) zijn duidelijk en onderbouwd aangegeven.

Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook herleidbaar welk ongerief individuele dieren zullen ervaren. De DEC is ook van mening dat de aanvraag voldoende samenhang heeft en toetsbaar is.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet).
Voor zover de DEC bekend is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën 'Fundamenteel onderzoek' 'translationeel of toegepast onderzoek' sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe

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

Het directe doel van dit project is het aanbrengen van genetische modificaties waardoor muizen humane antilichamen produceren. Deze muizen zullen in vervolg projecten worden geïmmuniseerd met relevante antigenen. Uit deze muizen zullen vervolgens de cellen die de humane antilichamen produceren worden geïsoleerd.

Het uiteindelijke doel is hiermee in vitro monoclonale antilichamen te produceren die gebruikt kunnen worden voor therapie of diagnose in mensen. Dit betreft bijvoorbeeld antilichamen tegen virussen, tegen tumorantigenen of tegen verschillende slangen giften.

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met dit type onderzoek. Een aantal van de reeds geproduceerde humane antilichamen worden op dit moment getest in klinische trials.

De DEC is van mening dat er binnen dit project een directe relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

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

De belangrijkste belanghebbenden bij de experimenten in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de patiënten/maatschappij, de wetenschap, de onderzoekers en de instelling.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De integriteit wordt aangetast door het aanbrengen van de genetische modificaties, de beperking van hun natuurlijkgedrag (huisvesting in een proefdierlaboratorium), individuele huisvesting (in geval van de fokmannen) en het gedood worden in het kader van het experiment, voor de fenotypering of als surplus. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Het welzijn van de dieren wordt aangetast door de experimentele interventies en de huisvesting.

Er is geen sprake van genetisch gemodificeerde lijnen met risico op een fenotype resulterend in constitutioneel ongerief.

Het beschikbaar krijgen van lijnen die na immuniseren uitsluitend humane antilichamen produceren (die dus zelf geen immuunrespons in patiënten meer induceren) betekent een belangrijke verbetering van die toepassingen waarbij op dit moment ook al antilichamen, vaak uit grotere dieren, worden gebruikt. Bovendien is het de verwachting dat met het beschikbaar komen van deze in muizen geproduceerde humane antilichamen het gebruik en de toepassing hiervan zal toenemen. Dit is van direct belang voor de betreffende patiënten maar ook voor hun directe omgeving en de maatschappij (zorgvraag).

Voor de onderzoekers en de aanvragende instantie geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Carrière mogelijkheden en status kunnen door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor de instelling is het van belang om financiële middelen te verkrijgen voor dit soort onderzoek.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze,

leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.

De aanvrager verwacht geen substantiële milieu effecten. De commissie ziet, gezien de aard van de experimenten, geen reden om aan te nemen dat die zich toch zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

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

Er is binnen de instelling een gespecialiseerde afdeling voor het maken van genetisch gemodificeerde muizen. De aanvragende onderzoeksgroep heeft jarenlange ervaring met het genereren van humane antilichamen in muizen en met het in vitro produceren van monoclonale humane antilichamen met de uit deze muizen geïsoleerde antilichamen producerende cellen. Er lopen op dit moment klinische trials met de door deze groep geproduceerde humane antilichamen.

De commissie is overtuigd van de kennis en kunde en kwaliteit van het werk van de aanvrager en dat is voldaan aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van de voorgestelde dierproeven.

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

De directe doelstellingen van het project zijn realistisch. Er is met de methoden voor het aanbrengen van de genetische modificaties al veel ervaring binnen de instelling. De voorgestelde experimentele opzet sluit naadloos aan bij het aangegeven directe doel. De vervolg experimenten (het immuniseren van de genetische gemodificeerde muizen) sluit aan bij het uiteindelijke doel.

De indieners hebben veel ervaring in dit onderzoeksveld.

De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de beschreven doelstellingen. De commissie is in algemene zin overtuigd van het belang van het voorgestelde onderzoek met de voorgestelde modellen.

Welzijn dieren

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

Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)

- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)

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

Alle dieren worden gehuisvest conform bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Met uitzondering van de dekmannen. De ervaring is dat deze na de dekkingen veel agressief gedrag vertonen wanneer ze weer in groepen worden gehuisvest. Na de eerste dekking zullen deze dieren daarom individueel worden gehuisvest.

Deze afwijkende huisvestingsomstandigheden van dekmannen wordt algemeen toegepast en is voldoende onderbouwd. Het ongerief ten gevolge van de huisvesting is realistisch ingeschat.

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

Alle operaties worden uitgevoerd onder algehele anesthesie en adequate perioperatieve pijnbestrijding.

Alle factoren die bijdragen aan het ongerief zijn benoemd. Het ongerief voor alle individuele factoren/interventies is realistisch ingeschat. Op basis van de ongeriefinschattingen voor elk van deze verschillende onderdelen is uiteindelijk inzichtelijk het cumulatieve ongerief ingeschat.

Er zal bij geen van de te genereren lijnen sprake zijn van een fenotype met constitutioneel ongerief.

De commissie acht de ongeriefinschattingen realistisch en voldoende onderbouwd.

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

De integriteit van de dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik, het genetische gemodificeerd zijn, de door de huisvesting beperking van het natuurlijk gedrag (waaronder individuele huisvesting van de fokmannen) en omdat ze in het kader van het experiment, de fenotypering of als surplus worden gedood.

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

Er zijn duidelijk humane eindpunten beschreven. Het is de verwachting dat geen enkel dier ten gevolge van de experimenten deze humane eindpunten zal bereiken. Door de uitgebreide ervaring van de indiener met dit soort experimenten en de aard van de genetische modificaties lijkt dit een realistische aanname.

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

Voor het uiteindelijke gebruik van de onder dit project gegenereerde genetische modellen (het produceren van humane antilichamen) zijn vooralsnog geen ex vivo en in-silico experimenten mogelijk. De afweging hierover vindt plaats bij de advisering over de projecten waarin de immunisaties in deze muizen beschreven staan. Dit wordt afgedekt door de voorwaarde dat alleen onder dit project genetisch gemodificeerde muizen kunnen worden geproduceerd als in vervolgprojecten deze modificaties en het gebruik van deze muizen zijn vergund.

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

Het aantal dieren is realistisch ingeschat. Er wordt voor het genereren van een nieuwe lijn een gemiddelde aantal dieren opgevoerd dat algemeen geaccepteerd is en waarvan de realiteitswaarde de afgelopen vele jaren is bewezen.

De aantallen donoren voor de feederzellen zijn proportioneel ten opzichte van het maximaal aantal te creëren lijnen.

Bij de keuze voor een bepaalde strategie voor het maken van de genetisch gemodificeerde lijnen wordt nadrukkelijk gestreefd naar het gebruik van zo min mogelijk muizen en zo min mogelijk fokrondes.

Het is de verwachting dat bijvoorbeeld de gevasectomeerde en de fok-mannen ook voor andere experimenten (bijvoorbeeld het invriezen van embryo's) worden gebruikt. Dit gebruik valt buiten de reikwijdte van de Wod, maar is wel ethisch relevant.

Er spelen bij de onderbouwing van de aangegeven aantallen dieren geen statistische overwegingen.

De commissie acht het aantal dieren voldoende en realistisch onderbouwd.

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

Het betreft zeer gestandaardiseerde en algemeen toegepaste handelingen.

De commissie is dan ook van overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

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

Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

Het gebruik van mannen en vrouwen wordt geheel bepaald door het beoogde doel

en het type experiment.

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

De dieren worden gedood in het kader van de experimenten (waaronder ook fenotypering) of na enige tijd als surplus. De muizen van de uiteindelijk genereerde lijnen worden gebruikt in vervolgonderzoek die buiten de kaders van deze aanvraag vallen.

De dieren worden gedood met een dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn.

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

Er worden in deze aanvraag geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

NTS

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

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

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het genereren van 50 nieuwe genetisch gemodificeerde muizen lijnen voor het in muizen produceren van humane antilichamen voor uiteindelijk therapie en diagnose, het gebruik van 7850 muizen, de aantasting van hun integriteit en het ongerief dat de dieren daarbij wordt aangedaan en is daarbij aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

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

Bij 20% van de dieren zal sprake zijn van matig ongerief als gevolg van de superovulatie (de eiceldonoren) en de embryo implantaties (de foster moeders). Bij 80% van de dieren is er sprake van gering ongerief. Dit betreft de founders, de F1 dieren (fenotypering) en de embryo donoren voor de stamcellen en de feedercellen. De doelstellingen kunnen niet zonder het gebruik van dieren worden behaald. De

onderzoekers hebben alle maatregelen en voorzorgen genomen om onnodig lijden van de dieren te voorkomen en het aantal dieren te beperken. Bij alle dieren is sprake van een aantasting van hun integriteit.

Het onder dit project produceren van genetisch gemodificeerde muizen lijnen is de eerste stap naar de productie van volledig humane antilichamen voor toepassing in therapie en diagnose bij mensen. Het betreft toepassingen waarvoor op dit moment nog antilichamen opgewekt in grote dieren worden gebruikt (met het risico op ongewenste reacties tot zelfs anafylactische shocks) of waarvoor nog geen antilichamen beschikbaar zijn. Het uiteindelijk produceren van deze antilichamen valt niet onder dit project.

Het is de verwachting dat het uiteindelijk op grote schaal beschikbaar komen van deze humane antilichamen een groot maatschappelijk belang zullen dienen (preventie en versneld herstel van ziekten en voorkomen van overlijden (bijvoorbeeld met antilichamen opgewekt tegen virussen en slangengiften) en een verbeterde diagnose (bijvoorbeeld bij kanker)). Er worden al klinische trials uitgevoerd met een aantal van deze antilichamen.

Wetenschappelijk is het onderzoek met deze transgene muizen van belang omdat het inzicht geeft in de factoren die een rol spelen bij het opwekken van antilichamen, het immuniseren met 'problematische antigenen' en in de structurele eigenschappen van antilichaammoleculen.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke en klinische inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke en klinische reputatie, wat vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Carrièremogelijkheden en status kunnen door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke wetenschappelijke en maatschappelijke doelen dient (kennis, gezondheid).

Het genereren van nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen die uiteindelijk resulteren in een verbetering en uitbreiding van de therapeutische en diagnostisch mogelijkheden met humane antilichamen dient naast een direct belang voor de patiënten zelf ook een groot belang voor de direct betrokkenen en de maatschappij als geheel

De commissie acht het belang van dit onderzoek substantieel.

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

De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling: het genereren van genetisch gemodificeerde muizenmodellen waarmee na immunisaties uiteindelijk humane antilichamen voor therapie en diagnose kunnen worden geproduceerd. De doelstellingen vertegenwoordigen een substantieel belang voor het onderzoeksveld, de kliniek en de maatschappij. De DEC is overtuigd van de kwaliteit van het onderzoek en de uitvoering hiervan.

Zij is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de directe en uiteindelijke doelstellingen binnen de looptijd van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat voorkomen wordt dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten zullen ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van mening dat aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent de 3 V's en de kwaliteit van het onderzoek is voldaan en dat het hierboven genoemde belang voor de betreffende patiënten en de samenleving als geheel het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van welzijn en integriteit) rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd - zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



Form Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The ability to artificially introduce specific genetic modifications in mice by the use of embryonic stem cells or by zygote injection has made the production of human Abs in mice possible. Using these human Abs,

produced in mice for human therapy, prevents the initiation of a human immune response against mouse Abs (HAMA).

We have produced 2 different genetically modified (GM) mouse models that produce human antibodies. One model is producing 'classical' Abs: tetramers consisting of two heavy and two light chains (H2L2). The other GM mouse model is producing heavy chain only Ab (HCAbs) and lacking the light chains. H2L2 Ab are well known for their use in therapy. We have successfully generated human antibodies already in both mouse models. For example HCAb against 10.2.g (exploring the use in congenital diseases). New GM mouse models will only be generated if their use is described in a project license. For example, some of the newly generated mouse models in this proposal will be immunized under license application

10.2.g

Both these GM models have a limited number of genes available for the production of human Abs. All

10.2.g

Up until now, not all antigens gave satisfactory immune responses leading to therapeutic, diagnostic and/or human antibodies with the desired characteristics in our existing models. Therefore, either we are trying to improve both GM mouse models by making modifications to the transgenic antibody locus or other genes involved in the regulation of the immune response. For instance, by adding more DNA regions, coding for the variable parts of the Abs, we may increase number and diversity of the antibody repertoire upon immune response. Adding or deleting genes involved in the regulation can lead to an enhanced immune response and a boost of produced Abs. Specific human Abs will be obtained by immunizing the GM mice with an antigen. However, when this antigen is similar or identical to a mouse endogenous protein, the mouse will be tolerant and not produce Abs against the antigen. In contrast, the mouse will not be tolerant if the protein cannot be expressed due to adjustments made in the DNA. This strategy can only be applied if the protein is not essential for the mouse. In some cases, the antigen for immunization is not identical to the mouse endogenous protein, but difficult to produce *in vitro*. Then, with standard immunization, is not possible to obtain desired Abs. We can modify the DNA of the mice in such a way that at a certain moment the GM mouse will start to produce the antigen. Since the antigen is new and foreign, the GM mouse will start to produce human Abs.

Before using human Abs, produced by GM mice, they have to be extensively tested in preclinical research. If a GM mouse model does not exist for testing, it has to be generated, preferably with the same genetic background as the antibody producing GM mouse model.

By constantly trying to improve our existing GM mouse models or making new GM models, we make sure that the best suitable mouse model is used for any particular immunization or testing therapy. Using the most suitable model for generating antibodies against a specific antigen will reduce the number of unsuccessful immunisation attempts to obtain antibodies with the desired characteristics and therefore less animals are needed. To obtain human antibodies from these new mouse models, mice have to be immunized.

3.2 Purpose

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

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

The overall objective of this project proposal is the generation of new/improved GM models to obtain or to test human antibodies.

The first objective of this proposal is to improve our existing GM mice leading to the production of a broader repertoire of human Abs with excellent physicochemical properties for drug development and therapy. In addition, improving existing GM mouse models may lead to the production of therapeutic antibodies to more antigens.

The second objective of this proposal is to generate 10.2.g [REDACTED] When antigens are similar/identical to mouse endogenous proteins, mice are tolerant. Deleting the endogenous protein in mice prevents tolerance. This is possible for non-essential proteins only.

The third objective of this proposal is to generate GM mice expressing antigens that are difficult to produce *in vitro*. These antigens cannot result in an appropriate antibody response by standard immunization methods. The generation of the GM model will involve making double transgenic GM mice expressing a 10.2.g [REDACTED]

The fourth objective of this proposal is the generation of GM models for pre-clinical testing of antibodies generated and tested initially *in vitro*.

The last objective is to isolate embryonic stem cells (ESCs) directly from our GM models. These ESC clones are validated for their ability to produce chimeras with germ line potential. The validated ESC clones form the starting material for further genetic engineering and the generation of new mice models. In addition, since our GM mouse models have multiple genetic alterations, these ESCs will serve as alternative back up for calamities. For this objective, also additional mice are needed for the isolation of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) to support the growth of ESCs clones.

Our long-lasting experience and previous results show that the objectives of this project proposal are realistic and achievable.

3.3 Relevance

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

Immunizing the GM models is an efficient way to isolate fully human Abs with therapeutic/ diagnostic potential.

For example, we recently obtained anti SARS CoV-2 Ab (10.2.g [REDACTED]) with virus neutralization capacity. 10.2.g [REDACTED] will not only have a scientific relevance in studying the virus and choosing antigens for vaccine development but, once approved and in use, will have a huge social relevance in preventing people from getting ill, speeding up their recovery, reducing death rates and contributing to the recovery of collapsed economy worldwide.

Moreover, our 10.2.g [REDACTED] antibody is currently tested as immunotherapy 10.2.g [REDACTED] on numerous patients with different tumors (clinical trial phase II).

Currently, we are working on developing human antibodies against different snake venoms. Worldwide, venomous snakebites cause ±125.000 deaths and maim 450.000 people yearly, mostly in poor rural areas. Current treatment is the use of serum from large animals and may cause adverse reactions including anaphylaxis. Our human antibodies can radically improve anti-venoms, their specificity and their broad availability.

3.4 Research strategy

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

We have generated 2 GM mice models that produce antibodies with fully human variable regions. Such animals are used for immunization with therapeutically relevant antigens to isolate fully human antibodies for diagnostic and therapy. GM mice do not produce 10.2.g [REDACTED]

To improve the antibody production in general, DNA modification will be done: 1) To the transgenic constructs already present in the current GM models; 2) By alteration of other genes related to the immune response that might potentiate or reduce some effector functions (both objective 1). For some specific antigens that are difficult to produce *in vitro* and/or for which the conformation and cell surface expression is important modifications to the original GM model will consist of 3) introduction of the antigen as a transgene under the tetracycline-on system (objective 3). 4) For limited number of antigens for which the GM mouse model is tolerant since human and mouse protein are similar/identical, we will

modify the GM model by 10.2.g protein (if not essential gene; objective 2). 5) To test therapeutic Abs in the pre-clinical studies we will need to generate a specific GM mouse model (if such does not exist; objective 4).

When a line is to be used for multiple or difficult DNA modifications, *de novo* isolated and validated ESCs clones will be the preferably starting material for further modifications (objective 5).

For the proposed generation of GM models for fundamental and applied immunological research we will use three basic pathways:

The zygote pathway – This route is based on genetic engineering directly in fertilized oocytes (zygotes). A small amount of DNA, RNA and/or protein is injected into zygotes. The injected zygotes are surgically implanted in the oviduct of a foster mother, which brings the embryos to term, and weans the pups (founders). These litters are genotyped and founder mice with the correct modification(s) are kept.

The blastocyst pathway - This route is based on genetic engineering in cultured embryonic stem cells (ESCs). The genetically modified ESCs are injected into blastocysts, i.e. 3.5-day embryos. These injected blastocysts are surgically implanted in the uterus of a foster mouse. The foster mother brings the embryos to term, suckles and weans the pups (founders). These founders are screened for contribution of the genetically modified ESCs based on coat-colour contribution or by genotyping using a strain specific quantitative real-time PCR. All chimeras are tested for germ line transmission.

For all pathways, positive founders will be bred and maximal 5 mice of the newly established line will be killed for analysis.

The GEMM-Stem Cell pathway - The GEMM-Stem Cell (SC) pathway is a modified blastocyst route. Instead of using established wild type stem cell clones, new ESCs clones can be derived directly from existing genetically engineered mouse models. These GEMM-SC clones are validated for their ability to produce chimeras with germ line potential. The validated GEMM-SC clones form the starting material for further genetic engineering and mice are generated following the blastocyst pathway.

ESCs used in the blastocyst and GEMM-Stem Cell pathways are cultured on a feeder layer of primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs).

New GM mouse models will only be generated if their use is described in a project license.

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

For the generation of GM mice and technology development we use the following groups of mice:

1. Donor female for isolation of oocytes, embryos or MEFs
2. Fertile stud male
3. Vasectomized stud male
4. Foster mother
5. Founders
6. F1 mice for analysis/phenotyping

In table 1, an overview is provided of which types of experimental mice are required for each part of the research strategy. The pool of vasectomized stud males is used from the cryopreservation/validation program running in the transgenesis unit to reduce the numbers of animals needed. Fertile studs will be reused for mating with the donor female and will not be used for animal experiments. The experimental procedures and accompanying expected discomfort are listed in table 2. The procedures performed on the mice are approved standard operating procedures (SOPs).

Table 1. Types of experimental mice required to generate GM mice

	Generation of GM mice			
	Zygote pathway	Blastocyst pathway	GEMM-SC derivation pathway	GEMM-SC validation pathway
1. Donor females	Yes	Yes	Yes	Yes
2. Fertile stud males	Yes	Yes	Yes	Yes
3. Vasectomized stud males*	Yes	Yes	No	Yes
4. Foster mothers	Yes	Yes	No	Yes
5. Founders	Yes	Yes	No	Yes
6. F1 mice for analysis/phenotyping	Yes	Yes	No	No

*) Vasectomized stud males will be used from the cryopreservation/rederivation program running in the facility.

Table 2. Types of procedures and level of discomfort

	Gender	Goal	Procedures	Discomfort
1. Donor females	F	Embryo isolation	Mate with fertile stud / Plug check / Cull mouse by cervical dislocation / Harvest embryos for blastocyst injections, ESCs isolation or MEFs isolation.	Mild
		Oocytes isolation	Superovulation (2 i.p. injections, SOP) / Cull mouse by cervical dislocation / Harvest oocytes	Moderate
2. Fertile stud male	M	Fertilization	Mate with female donor mouse (max. 3x per week, 4 months active)	None
3. Vasectomized stud male*	M	Mock fertilization	Mate with foster mother	None
4. Foster mother	F	Oocyte or embryo implantation	Mate with infertile stud male / Plug check next day / Surgical embryo implantation under injection anesthesia and pain relief (SOP) / Birth of GM pups / Wean litter / Cull mouse	Moderate
5. Founders	M & F	Identification, DNA extraction and analysis	Distal phalanx clipping of mouse at 4-5 days after birth (SOP) for identifying and genotyping.	≤ mild

6. F1 mice for analysis/phenotyping	M & F	Analysis of phenotype	Cull mouse by cervical dislocation/ Isolate tissues for analysis	Mild
-------------------------------------	-------	-----------------------	--	------

*) Infertile stud males will be used from the cryopreservation/rederivation program running in the facility.

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

The objective of this project proposal is to generate new/improved GM models to obtain or to test human antibodies (originated from our GM models). The choice of the transgenesis pathway depends on the type of DNA modifications to be made. For instance, if many subsequent modifications have to be made to the GM model, the GEMM-Stem Cell pathway (and thus the derivation of new ESCs clones) will be the obvious choice. Generating a simple deletion using CRISPR/Cas will most likely follow the zygote route. Choices of the pathway will depend on numbers of mice involved (keeping numbers to minimum) and the chance of success in modifying the genome.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Generation of GM mice, ESC derivation/validation.
2	ESC-MEF-derivation
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10.2.g
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 10.2.g
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | Generation of GM mice, ESC derivation/validation. |

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Three basic pathways currently exist for the generation of GEMMs:

The zygote pathway – This route is based on genetic engineering directly in fertilized oocytes (zygotes). A small amount of DNA, RNA and/or protein is injected into zygotes. The injected zygotes are surgically implanted in the oviduct of a foster mother. This foster mother brings the embryos to term, suckles, and weans the pups (founders). These founders are genotyped. Founder mice with the correct modification(s) will be bred to establish a GM line. Maximal 5 F1 mice/new line will be killed for analysis.

The blastocyst pathway - This route is based on genetic engineering in cultured embryonic stem cells (ESCs). The genetically modified stem cells are injected in blastocysts, i.e. 3.5-day embryos. These injected blastocysts are surgically implanted in the uterus of a foster mouse. The foster mother brings the embryos to term suckles and weans the pups (founders). These founders are screened for contribution of the genetically modified stem cells based on coat-colour contribution or by genotyping using a strain specific quantitative real-time PCR. Chimeras are delivered bred for germline transmission and to establish a GM line. Maximal 5 F1 mice/new line will be killed for analysis.

The GEMM-Stem Cell pathway - The GEMM-Stem Cell (SC) pathway is a modified blastocyst route. Instead of using established wild type stem cell clones, new ESCs be derived directly from existing genetically engineered mouse models. These GEMM-SC clones are validated for their ability to produce chimeras with

germ line potential. The validated GEMM-SC clones form the starting material for further genetic engineering and mice are generated following the blastocyst pathway.

To minimize backcrossing new GM mouse models will preferably be generated directly on the desired strain or GM mouse model leading to a reduction of mice needed for breeding. In addition, with the latest technological advances in transgenesis, such as CRISPR/Cas9 gene editing and improved ESC culture conditions, multiple genetic modifications can often be introduced in the same experiment. This prevents the need for intercrossing of GEMMs to obtain the desired set of genetically modified alleles and again leading to a reduction in mice.

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

For the generation of new GM mice we use the following groups of mice:

1. donor mice
2. fertile stud males
3. Vasectomized stud males
4. foster mothers
5. Founders
6. F1 mice for analysis/phenotyping

The procedures for each different type of mouse is described in table 1.

Table 1 Types of procedures and level of discomfort

	Gender	Goal	Procedures	Discomfort
1. Donor females	F	Embryo isolation	Mate with fertile stud / Plug check / Cull mouse by cervical dislocation / Harvest embryos, i.e. zygotes, morulae or blastocysts	Mild
		Oocytes isolation	Superovulation (2 i.p. injections, SOP) / Cull mouse by cervical dislocation / Harvest oocytes	Moderate
2. Fertile stud male	M	Fertilization	Mate with female donor mouse (max. 3x per week, 4 months active)	None
3. Vasectomized stud male*	M	Mock fertilization	Mate with foster mother	None
4. Foster mother	F	Oocyte or embryo implantation	Mate with infertile stud male / Plug check next day / Surgical embryo implantation under injection anesthesia and pain relief (SOP) / Birth of GM pups / Wean litter / Cull mouse	Moderate
5. Founders	M & F	Identification DNA extraction and analysis	Distal phalanx clipping of mouse at 4-5 days after birth (SOP) for identifying and genotyping.	≤ mild
6. F1 mice for analysis /phenotyping	M & F	Analysis of phenotype	Cull mouse by cervical dislocation/ Isolate tissues for analysis	Mild

*) Vasectomized stud males will be used from the cryopreservation/rederivation program running in the facility.

Four procedures involve treatment of the mice: 1) superovulation, 2) implantation 3) vasectomy and 4) distal phalanx clipping or clipping of the ear.

Superovulation: ≥ 5-week-old female mice receive 2 i.p. hormone treatments, 48h apart. Based on our experience, superovulation at this age results in a maximum number of fertilized oocytes of good quality

for most laboratory mouse strains. Superovulation of older mice dramatically reduces the number of oocytes. After the last treatment, the female mouse is mated with a stud male. Next day a plug check is performed. Plugged females will be collected and set aside until usage. All female mice are culled 3.5 days post mating and embryos are isolated. SOPs apply.

Implantation: Two types of implantations are performed. 1) oocyte/2-cell implantation in the oviduct of a foster mother. 2) blastocyst implantation in the uterus of a foster mother. Surgery is performed on 8-16 week old plugged female mouse (weight 18-30g) following SOP and takes on average 20 minutes per mouse.

In brief, a 1 cm incision is made parallel to the dorsal midline to expose the oviduct and uterus.

For the oocyte/2 cell implantation: The infundibulum is located and using a fine glass capillary pipet, 20-25 oocytes/2-cell embryos are inserted into the oviduct.

For the blastocyst implantation: With a syringe, a small hole is made in the uterus wall. With a small glass capillary pipet 8-10 blastocysts are inserted through the hole into the uterus.

Next, the oviduct-uterus is placed back in the abdomen and the peritoneum is closed with 1-2 sutures.

Wound clamps are used to close the skin, which are removed 8-10 days after the operation. Mice are anesthetized and post operation pain relief is administered

Distal phalanx clipping: Distal phalanx clipping of mouse at 4-5 days after birth following SOPs for identifying and genotyping.

Founder mice of interest are used for breeding and for the initial welfare assessment. If the founder shows a phenotype with discomfort, it will not be bred further.

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

Statistical methods are less applicable to these activities. We use state-of-the-art technology for the generation of GM mice. We constantly monitor our achieved efficiencies and success rates, and optimize procedures where needed, thereby minimizing the number of animals.

B. The animals

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

Mus musculus: GM and normal mice from regular laboratory strains and crossings with a maximal age of 240 days. All mice will be bred in our own institute or are coming from registered commercial breeders or NVWA approved institutions.

Our own experience over the last 20 years and those of others show that for the generation of GM mice on average 150 mice are needed. (30 donor mice, 20 foster mothers and 100 pups). The vasectomized males needed for the generation of pseudo pregnant foster mothers will be used from the cryopreservation/rederivation program running in the transgenesis unit. Fertile studs are only used for mating with the donor females.

We will only generate GM mice if their use is described in a project license.

Based on experience, we expect to generate maximal 10 lines per year. In the coming 5 years this will be maximal 50 lines (50 x 150 mice = 7500). Some of those will be generated using de novo isolated ESCs (Appendix 2).

For testing newly generated GM lined we need maximal 5 F1 mice/line. For 50 new lines, in a period of 5 years, the maximal number will be 250 mice.

Therefore we expect to use maximal 7750 mice to generate and analyze new GM mice the next 5 years.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

1- To reduce the number of mice used, the transgenic facility is using the vasectomized males from the cryopreservation/rederivation program also for generating pseudo pregnant foster mothers to generate GM mouse models. In this way we need less vasectomized males in total. Similarly, the colony of mice used for the generation of pseudo pregnant foster mice is shared between the cryopreservation, rederivation and GM mouse model generation programs. Again, leading to a reduction of mice being used.

2- If possible oocyte GM oocyte donors (and GM stud males) will be used to generate a GM line. In this way multiple rounds of breeding to obtain compound transgenic background will be avoided; saving on mice used. When numerous genome changes have to be made, this will be preferable done in ESCs. In this way multiple round of injections can be prevented: saving on mice used.

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

- 1) All surgical procedures (i.e. oocyte/embryo transfer into foster mothers) will be done using adequate anesthesia and analgesia. All techniques described used will be performed by experienced personnel.
- 2) To reduce discomfort because of the size difference between oocyte donor females and stud males, the minimal age of the female donor mice will be approximately 5 weeks. In contrast to older (mature) females, superovulation at this age will still produce a high number of oocytes of sufficient quality.
- 3) Whenever possible, mice will be housed socially and cage enrichment will be provided.
- 4) GM mice may not be entering the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Mice will be housed in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU if possible. However, after males have mated, they often show aggressive behaviour towards each others when housed socially. To

avoid fighting and stress of these males, they will be kept individually for those periods they are not used as breeding partner.

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Surgical procedures will be carried out aseptically under adequate anaesthesia and combined with peri-operative analgesia (long-acting). This procedure is subjected to change when new concepts or ideas about optimal anaesthesia/analgesia evolve.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In many cases it is difficult to predict the effect of a genetic modification. Based on our experience, in the vast majority (>99%) the GM founders do not show discomfort.

Explain why these effects may emerge.

We do not expect adverse effects.

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

Cage enrichment will be provided. The health will be daily checked by experienced personnel.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Discomfort:

Mice will be killed if:

1. birth defects affecting vitality occur
2. severe complications due to surgical procedures (bleedings, infections) occur
3. the mouse has severe wounds (for example due to fighting)
4. the mouse stops eating and/or drinking (loss of body weight, dehydration)
5. mild circulation and/or breathing problems occur
6. behavioral problems occur

Indicate the likely incidence.

We expect the incidence to be very low (less than 1%)

K. Classification of severity of procedures

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

Generation of lines:

Mouse	treatment	Discomfort	Number
Donor mice :	superovulation:	moderate 100%	600 mice
	natural mating:	mild 100%	900 mice
Foster mothers:	implantation:	moderate 100%	1000 mice
Offspring/founders:		mild >>99%,	5000 mice ¹
F1 mice for analysis:		mild	250

¹) not animal experiments

Animals in experiments:

Severity	#	%
Non-recovery	-	0
Mild	6150	79
Moderate	1600	21
Severe	-	0
Total	See question B	100%

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

1. Donors mice are killed to collect the oocytes/embryos.
2. Fertile stud males are killed at the maximum age of 240 days or earlier if the libido has decreased. After this age their libido is diminished and they are not suitable anymore
3. Infertile stud males – Male mice are killed at the maximum age of 240 days or earlier if the libido has decreased. After this age their libido is diminished and they are not suitable anymore
4. Foster mothers are killed after weaning of the pups. Optional they are used for health status screening.
5. Founders will be killed after breeding.
6. F1 GM will be killed for analysis.

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

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

X Yes



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10.2.g
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 10.2.g
- | | Serial number | Type of animal procedure |
|--|---------------|--------------------------|
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. | 2 | Timed pregnancies |

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In this project proposal, we want to isolate and validate de novo embryonic stem cells (ESCs) from our mouse models. Validated ESCs, that give germline transmission, can form the starting material for further complex genetic engineering and the generation of new mice models. In addition, these ESCs clones serve as alternative back up for calamities.

Timed pregnancies are needed to derive de novo ESCs lines. Successful culturing of ECSs depends on the quality of feeder cells, since they secrete the extracellular matrix that directly affects the growth of ESCs. Primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) function as feeder cells to maintain mouse ESCs in an undifferentiated state. For *de novo* ECSs establishment we need blastocyst stage mouse embryos. For generation of MEFs we need mouse E11-15 embryos. Timing of the pregnancy can done by checking copulation plugs.

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

Female mice will be put with the stud mice. Next morning females will be checked for the presence of copulation plugs. Plugged females are collected and put in a separate cage until used. For ESCs derivation, plugged females will be killed at day E3.5. Blastocyst will be isolated and put in culture to derive ESCs. For primary MEFs cultures, plugged females will be killed at E11-15. Embryos will be isolated and put in culture to obtain MEFs.

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

Statistics are not directly applicable. Plugs are checked by trained personnel. In this way, chances on wasting mice are reduced. Primary MEFs can be frozen for future usage preventing the repeated pluggings and isolations. We will not generate ESCs clones from all newly generated mice, but only from those that have potential to be further modified in vitro (estimate 1 out of 10 newly generated lines). The rest of the lines will be frozen as embryo's (multiple homozygous) or by sperm cryopreservation

B. The animals

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

Mus musculus, GM or normal mice, females 8-180 weeks of age. 'For ESCs derivation, we use our GM (homozygous). On average 4-5 blastocyst are isolated from a plugged female. 1 in 20-25 cultures will yield an usable ESCs clone, i.e. correct karyotype, undifferentiated state etc. For safe cryopreservation and future modifications, we need at least 2 independent ESCs clones. With these numbers, we can derive and store 1-2 new ESCs lines per year (Approximately 50 plugged females). To derive the MEFs, necessary for deriving and culturing the ESCs clones, we need about 10 plugged normal female mice per year, 50 in 5 years.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

De novo ESCs are used when numerous genome changes have to be made. In this way multiple round of injections, using numerous mice can be prevented. Modifications to the genome can be checked in the ESCs. This saves on the number of mice used for analysis of the modification.

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

Mice will be housed socially (i.e. female mice with the same plug date are housed together). Cage enrichment will be provided.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

X No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

No adverse effects on animals' welfare is expected.

Explain why these effects may emerge.

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

Cage enrichment will be provided. The health will be daily checked by experienced personnel.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Discomfort:

Mice will be killed if:

1. the mouse has severe wounds (for example due to fighting)
2. the mouse stops eating and/or drinking (loss of body weight, dehydration)
3. mild circulation and/or breathing problems occur
4. behavioral problems occur

Indicate the likely incidence.

<<1%

K. Classification of severity of procedures

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

Embryo donor mice:

Severity	#	%
Non-recovery	-	0
Mild	100	100
Moderate		0
Severe	-	0
Total	See question B	100%

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Donor mice will be killed by cervical dislocation for collecting embryos as a source of ESCs or primary MEFs.

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

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

Yes



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

- | | |
|------------------------------|--|
| 1.1 Titel van het project | De generatie van nieuwe muismodellen voor fundamenteel en toegepast immunologisch onderzoek met humane antistoffen |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Transgeen, modificatie, muismodel, inductie, antistoffen |

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

- | | |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | <p>We hebben genetisch gemodificeerde (GM) muizen ontwikkeld die menselijke antistoffen kunnen maken wanneer ze geïmmuniseerd worden met een lichaamsvreemde stof (antigen). De Immunisaties van de onder dit project gegenereerde muizen zijn onderdeel van een ander project. Menselijke antistoffen kunnen gebruikt worden in strijd tegen diverse ziektes bij mensen. We hebben bijvoorbeeld al menselijke antistoffen verkregen tegen virussen en kanker.</p> <p>We proberen onze GM-muizenmodellen steeds verder te verbeteren zodat tegen meer antigenen betere antistoffen gemaakt kunnen worden. Als</p> |
|---|---|

bijvoorbeeld het antigen te veel lijkt op een eiwit van de muis zelf dan zal de muis geen antistof maken tegen het antigen. Dit kan worden voorkomen door het DNA van de muis aan te passen zodat het eiwit niet meer gemaakt wordt. In sommige andere gevallen is het maken van een antigen in een reageerbuis niet mogelijk. Om toch menselijke antistoffen tegen deze antigenen te verkrijgen willen we het DNA van de muis aanpassen zodat deze het antigen op een bepaald moment zelf gaat maken. Doordat de muis dit antigen nog nooit 'gezien' heeft zal het menselijke antistoffen gaan maken. Voor meerdere (ingewikkelde) aanpassingen van het DNA willen we embryonale stamcellen (ESCs) isoleren uit onze muismodellen. Voor het kweken zijn embryonale fibroblasten (MEFs) nodig, die uit vroege muis embryo's worden geïsoleerd. De DNA-aanpassingen kunnen we dan doen in celweek. ESCs met de juiste DNA-veranderingen worden gebruikt voor de generatie van nieuwe muizenlijnen. ESCs kunnen ook worden ingevroren als back-up van de muizenlijnen. Voor het testen van de menselijke antistoffen uit muizen voor therapie bij de mens moeten ze uitvoerig worden getest in preklinisch onderzoek. Als hiervoor geen GM-muismodel bestaat, dat de ziekte nabootst, zal het moeten worden gegenereerd.

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

We willen voor medisch relevant antigenen menselijke antistoffen met therapeutische en/of diagnostische waarden produceren. Dit willen we bereiken door de bestaande muizenlijnen aan te passen, afhankelijk van het antigen.

Voor het preklinisch testen van humane antistoffen willen we GM muizen maken. Deze veranderingen, waardoor ziektes worden nagebootst, zullen resulteren in modellen voor onderzoek naar potentiële therapieën.

Onze muizenmodellen hebben al enkele, wetenschappelijk erg interessante humane antistoffen geproduceerd, die van groot belang kunnen zijn voor de samenleving.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Mus musculus (muis), maximaal 7850

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

Een gedeelte van de muizen ondervindt matig ongerief door hormooninjecties. Een ander gedeelte van de muizen ondervindt matig ongerief door een chirurgische ingreep. Hierbij worden de dieren onder narcose worden gebracht. Voor na de operatie krijgen de dieren pijnstilling.

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

20% van de muizen heeft maximaal matig ongerief door hormooninjecties of een chirurgische ingreep. 80% van de muizen heeft maximaal licht ongerief omdat ze worden gedood voor de isolatie van vroege embryo's, ESCs of embryonale fibroblasten (MEFs) of omdat ze een teenkootknip krijgen.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De muizen met de beoogde genetische wijziging worden gekruist voor het genereren van het nieuwe GM-muismodel. De muizen zonder genetische wijziging en/of die niet geschikt zijn voor het onderzoek worden gedood. De

muizen die gebruikt worden voor het isoleren van ESCs en MEFs zullen worden gedood.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

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

Voor het ontwikkelen van menselijke antistoffen is het gebruik van GM muizen noodzakelijk. Het ontwikkelen en selecteren van hoogwaardige antistoffen is nog niet mogelijk in een reageerbuis. Het enige alternatief voor het produceren van volledig menselijk antilichaam is isolatie uit het menselijke bloed. Dit is mogelijk voor sommige infectieziekten, maar niet mogelijk of niet effectief voor andere doelen.

4.2 **Vermindering**

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

De generatie van GM-muizenmodellen is een specialistische procedure. Hiervoor hebben wij een goed uitgeruste transgene faciliteit, waar uitgebreide ervaring voorhanden is. Binnen de transgene faciliteit worden nieuwe ontwikkelingen, die leiden tot een vermindering van het aantal proefdieren gevolgd, getest en waar mogelijk toegepast. Ingewikkelde genetische veranderingen, waarbij veel dieren nodig zijn, kunnen worden gedaan in ESCs, buiten het dier.

De steriele mannetjesmuizen, gebruikt in het invries-programma van de faciliteit, worden ook gebruikt voor de generatie van GM muizen.

4.3 **Verfijning**

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

De muis is zeer geschikt als proefdier omdat deze relatief eenvoudig te huisvesten is, een korte generatietijd heeft en grote nesten geeft. Bovendien is de muis genetisch goed gekarakteriseerd en vertoont fysiologisch veel overeenkomsten met de mens.

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

De handelingen voor het genereren van nieuwe GM-muismodellen en de dagelijkse controle van de betrokken muizen worden uitgevoerd door ervaren gekwalificeerd personeel. Waar nodig worden handelingen binnen deze dierproeven uitgevoerd onder narcose met pijnstilling. Indien de mate van ongerief hoger is dan vooraf ingeschat wordt de muis gedood. De muizen worden sociaal gehuisvest tenzij dit niet mogelijk is. Kooiverrijking voorziet in de behoeften van de muizen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

15

Van: 10.2.g
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202011004
Datum: maandag 9 november 2020 12:13:14
Bijlagen: image001.png
image002.png
image003.png
image004.png
image005.png
image006.png

Dear 10.2.g

Again the same point from the CCD. Again, please send the adjusted NTS to us (AWB) and I'll upload it to the CCD.
With best regards,

10.2.e

10.2.e

10.2.g

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: maandag 9 november 2020 10:06
Aan: 10.2.g 10.2.e
CC: 10.2.e 10.2.g
Onderwerp: Aanhouden AVD 10.2.g 202011004
Geachte 10.2.e

14

Op 18-09-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The generation of new mouse models for fundamentall and applied immunological research with human antibodies" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202011004. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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

Deel 3.1 is erg technisch en bevat veel vakjargon. Kunt u dit aanpassen zodat een leek kan volgen wat uw onderzoek inhoudt?

Ook voor de titel geldt dat dit moeilijk navolgbaar is voor een leek. Kunt u de titel aanpassen zodat dit wel navolgbaar wordt?

U spreekt bij punt 3.4 over hormooninjecties en chirurgische ingrepen. Het is niet duidelijk uit de NTS op te maken waarom die hormooninjecties nodig zijn, en wat de chirurgische ingreep inhoudt. Kunt u dit verhelderen?

Onduidelijkheden

Kunt u aangeven welke maatregelen u neemt om het aantal surplus dieren zo laag mogelijk te houden? Kunnen er surplus dieren worden ingezet in andere projecten?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

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.

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.