

	Dossier: AVD10800202317292	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Het herstel van kapotte longblaasjes na een longaanval stimuleren
NTS-identificatiecode	NTS-NL-683042 v.1, 28-11-2023
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) Longaanval Longweefselherstel Ontsteking
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Luchtwegenstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Respiratoire aandoeningen bij de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>COPD staat voor 'Chronic Obstructive Pulmonary Disease', een longziekte waarbij je longen zijn beschadigd. Een longaanval (exacerbatie) is een heftige en vaak nare ervaring die mensen met COPD meestal wel kennen. Een longaanval betekent dat longklachten zoals hoesten en benauwdheid plotseling verergeren. In dit project zal een team met expertise op het gebied van farmacologie (bestudering van geneesmiddelen), longweefselherstel en longaanvallen zich richten op twee doelen:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Kennis genereren over de vraag waarom longweefselherstel tijdens en na een longaanval bij COPD (een longziekte waarbij je longen zijn beschadigd) onvolledig is en welke periode na de longaanval het meest geschikt is om longweefselherstel te bereiken.2. Kennis uit doel 1 (en uit ons voorgaand onderzoek) gebruiken om nieuwe kandidaat-geneesmiddelen te onderzoeken voor longweefselherstel na een longaanval.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).	<p>Korte termijn De resultaten van onze studies zullen nieuwe inzichten verschaffen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan herstel van defect longweef bij COPD. Ze zullen ook kennis opleveren over routes en aangrijpingspunten, die kunnen worden gebruikt voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor COPD en andere longziekten. Indien de nieuwe kandidaat-geneesmiddelen werken, zullen we wereldwijd de eersten zijn die experimenteel bewijs leveren, dat het richten op de longaanval met nieuwe kandidaat-geneesmiddelen, kan helpen om schade te voorkomen, of te zorgen voor beter herstel van het longweefsel na een longaanval.</p> <p>Lange termijn Deze experimentele doelstellingen zullen de vertaalslag van onderzoek naar de klinische praktijk verbeteren, en nieuwe opties bieden voor regeneratieve medicijnen (medicijnen die profiteren van het vermogen van het lichaam om beschadigd weefsel zelf te herstellen) voor COPD.</p>

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>We zullen een recent ontwikkeld muismodel waarin COPD-longaanvallen worden nagebootst gebruiken. Om longaanvallen na te bootsen worden muizen blootgesteld aan sigarettenrook (in totaal ± tien weken) in combinatie met drie keer een bacteriële of virale blootstelling (beide bekende stimuli voor een longaanval). Muizen blootgesteld aan schone lucht fungeren als controlegroep. Muizen worden gedood op verschillende tijdstippen na de bacteriële/virale blootstelling (dag één) en tijdens de longherstelfase (dag vier/dag tien) om te kijken hoe het herstelproces in de long precies in gang wordt gezet (onder andere door de veranderingen in ontstekingsprofielen te bekijken).</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>In COPD-patiënten ziet men dat blootstelling aan rook leidt tot longschade en ontstekingen. Deze waarnemingen/symptomen willen we nabootsen met ons muismodel, waarin muizen worden blootgesteld aan sigarettenrook in combinatie met drie keer een bacteriële of virale blootstelling. Dit muismodel is eerder door onze groep uitgevoerd en we zagen geen ernstige bijwerkingen of overdreven reacties bij de muizen. Onmiddellijk na het roken zullen muizen duizeligheid ervaren en kan de vacht er rommelig uitzien (dit duurt minder dan één uur). Bovendien zullen muizen enige stress ervaren van zowel de rookblootstellingsprocedure als de anesthesie gerelateerd aan de toediening van de bacteriële of virale prikkels. Maar wij proberen deze stress te beperken door de dieren zoveel mogelijk door dezelfde en ervaren personen te laten behandelen.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>2668</td> <td>0</td> <td>961</td> <td>1654</td> <td>53</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	2668	0	961	1654	53
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	2668	0	961	1654	53												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Om de projectvragen te beantwoorden, moeten er weefsels/monsters van de dieren verzameld worden, zoals bloed en longen. Voor het verzamelen van deze weefsels/monsters moeten de dieren worden gedood</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

De ziekte COPD is het resultaat van complexe processen in de long, maar ook buiten de long, waardoor het moeilijk is om de ziekte met alleen longcellen na te bootsen. In dit project zullen we verschillende experimenten en technieken uitvoeren om kennis te genereren over de vraag waarom longweefselherstel tijdens en na een longaanval bij COPD onvolledig is:

1. Long organoïden (mini-orgaantjes) van gezonde vrijwilligers en COPD patiënten.
2. Muismodel waarin COPD-longaanvallen worden nagebootst.
3. Samples van COPD-patiënten tijdens een longaanval en in stabiele toestand.

Aangezien COPD een complexe ziekte is, gaan we in dit project bekijken of de resultaten van het in vitro model (model met longcellen) (1) vertaalbaar zijn naar de resultaten verkregen uit het muismodel (2) of de samples van de COPD patiënten (3). Indien dit het geval is, kunnen we nagaan of we in de toekomst de dierexperimenten kunnen vervangen en dus verminderen.

Bovendien zal het onderzoeken van de nieuwe kandidaat-geneesmiddelen voor longweefselherstel na een longaanval in het hele dier in plaats van in de long organoïden (mini-orgaantjes) ons ook een idee geven over de veiligheid van deze medicijnen voor toekomstige klinische studies (in de mens).

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Om de resultaten van de experimenten correct te kunnen interpreteren, gebruiken we informatie uit eerdere onderzoeken en statistische programma's/software om de minimaal benodigde groepsgrootte per individueel dierexperiment te berekenen. Verdere vermindering is naar onze mening niet mogelijk. Doordat we ervaring hebben met dit model binnen onze afdeling is de kans op mislukken kleiner.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

De muizen worden dagelijks gecontroleerd op welzijn en alle handelingen (rook blootstelling, toediening van bacteriële/virale prikkels en medicijnblootstelling) worden zo kort en efficiënt mogelijk uitgevoerd door ervaren en bekwaam personeel. Verschillende technieken om metingen te doen aan de luchtwegen en het afweersysteem van muizen zijn geoptimaliseerd binnen onze afdeling/onderzoeksgroep. Muizen worden voor aanvang van het experiment waar mogelijk getraind voor het experimentele proces.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

We zullen in ons muismodel, Balb/c-muizen gebruiken, omdat we met deze stam ook veel ervaring hebben in andere modellen gerelateerd aan sigarettenrookblootstelling. Deze muizenstam laat een grotere hoeveelheid neutrofielen (ontstekingscellen) in de longen zien na blootstelling aan

sigarettenrook in vergelijking met andere stammen. De instroom van neutrofielen in de longen is een belangrijk fenomeen bij COPD. We zullen voor onze studies vrouwelijke muizen gebruiken want er is een groot risico dat mannelijke muizen agressief tegen elkaar zullen zijn, vooral omdat de experimenten over een langere periode (\pm tien weken) plaatsvinden. Op deze manier kunnen we voorkomen dat muizen individueel gehuisvest worden of zelfs uitvallen als gevolg van vechten. De vrouwelijke Balb/c-muizen zullen acht tot tien weken oud zijn, jongvolwassen muizen, vergelijkbaar met de muizen in onze eerdere studies met COPD-modellen. Daardoor kunnen we studies vergelijken.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-10-2029
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10800
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3 <input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1 <input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2	
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel Voorletters Achternaam <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50
		Postcode en plaats	3584CJ UTRECHT
		Postbus, postcode en plaats	80125 3508TC UTRECHT
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Assistent Professor
		Afdeling	Farmacologie
		Telefoonnummer	

1.5	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Professor
		Afdeling	[REDACTED]
1.6	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
1.7	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Afdeling	
		Telefoonnummer	030-2531569
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl
		<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt 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 - 2023
		Einddatum (t/m)	31 - 10 - 2028
3.2	Wat is de titel van het project?	COPD exacerbations as a therapeutic window for lung repair?	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Het herstel van kapotte longblaasjes na een longaanval stimuleren	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC Utrecht
		Postadres	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
		E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.	Naam: UU-ASC	Afdeling:
	Straat:	Huisnummer:
	Postcode:	Plaats:
	Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA Plaats: UTRECHT
	E-mail: asc.factuur@uu.nl	
4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.	Ordernummer: CB.841910.3.01.011	

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht
	<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1
	<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
	Overige bijlagen, indien van toepassing
	<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
	<input type="checkbox"/>

6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)	Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:	
	<ul style="list-style-type: none"> 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 C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen. dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag. dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld. 	
	Naam	[Redacted]
	Functie	[Redacted]
	Plaats	Utrecht
	Datum	15 - 08 - 2023
Handtekening	[Redacted]	



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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Utrecht University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure	Serial number	Type of animal procedure
<i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	3.4.3.1	Murine COPD exacerbation model

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.

Key objective of this project proposal:

We will use a mix of *in vitro*, *in vivo* studies and clinical sample databases to understand the regenerative biology and differential patient biology associated with and following exacerbations. Using this knowledge, we will identify novel therapeutic targets to boost lung repair following an exacerbation. We will evaluate the regenerative efficacy of novel targets (max. 5) along with our previously identified target (████) in the context of the exacerbation period.

In this **appendix**, we will focus on the objectives, research questions and primary outcomes of the *in vivo* experiments described in the project proposal (**Phase 1** and **Phase 4**).

Phase 1: Murine model of COPD exacerbations – knowledge about lung tissue repair

Objective Phase 1:

To characterize the incomplete/insufficient lung tissue repair processes following an exacerbation

Research questions Phase 1:

- Why are lung tissue repair processes incomplete/insufficient following an exacerbation?
- How can cigarette smoke-induced inflammation impact the repair processes following an exacerbation?
- Which period after the exacerbation is most suitable to achieve recovery from lung injury?

Phase 4: Murine model of COPD exacerbations – drug testing to support lung tissue repair

Objective Phase 4:

In vivo proof-of-concept for the functional efficacy of novel targets in supporting repair mechanisms after COPD exacerbations.

Research questions Phase 4:

Can our previously [redacted] and newly (outcomes from Phase 1 and 2) identified target(s) therapeutically correct the defect(s) to accelerate endogenous lung tissue repair?

Primary outcome parameters:

- Repair pathway / inflammatory gene profiles in the lung (in epithelial lung progenitor cells)
- Lung organoids obtained from lung tissue of COPD exacerbation and control mice □ organoid growth, morphology and differentiation (immunofluorescence, gene expression profiles).

Murine COPD exacerbation model

We will use our recently developed and published murine model of COPD exacerbations (Utrecht University in collaboration with Maastricht University, Longfonds-TKI grant (10.2.16.119))(1,2). COPD is usually caused by cigarette smoking, and bacterial and viral respiratory infections are the main triggers of COPD exacerbations (3). To mimic an exacerbation, mice will be exposed to cigarette smoke (for 10 weeks) in combination with a second hit of a simulated bacterial or viral exposure: 1) Lipopolysaccharide (LPS), a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria that mimics infection by Gram-negative bacteria and stimulates TLR4, or 2) Polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C), a synthetic analog of double-stranded RNA, a molecular pattern associated with viral infections that stimulates TLR3.

With the addition of these LPS or Poly I:C triggers, we see an intensification of the COPD symptoms (inflammatory cells) (Figure 1) and lung emphysema is visible after this cigarette smoke exposure (72/73 days + LPS/Poly I:C triggers).

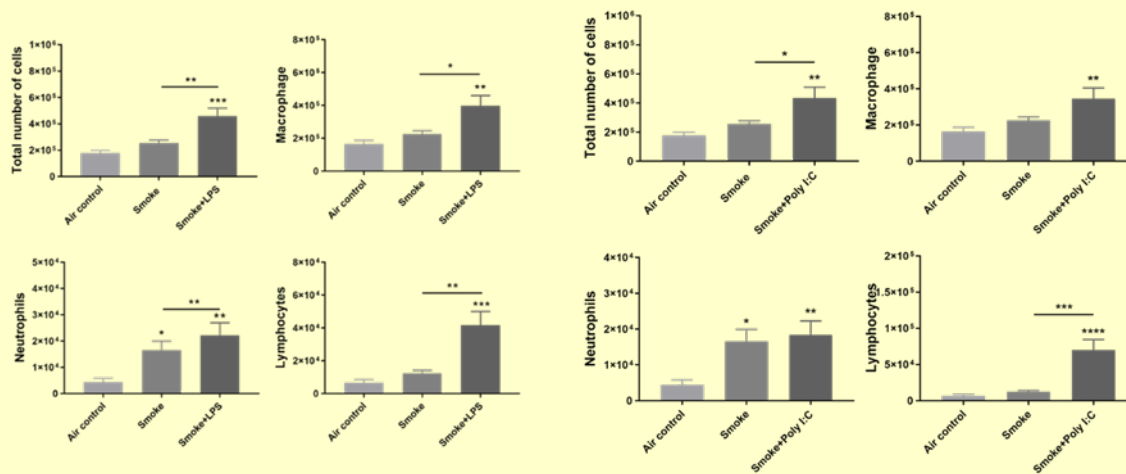


Figure 1. Inflammatory cell numbers in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Mice were exposed to air or cigarette smoke for 73 days, except on days 43, 53, and 63. On these days mice were treated with saline, lipopolysaccharide (LPS) (50 μ l of 2 μ g/mL) or polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) (50 μ l of 0.5 mg/mL) via intratracheal (it) instillation. Total number of BALF cells was determined and cells were differentiated into macrophages, neutrophils, and lymphocytes. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ vs air control (unless indicated otherwise).

Primary outcome parameters (Figure 2)

Using this murine model of COPD exacerbations, we would like to evaluate the dynamic changes in activation of lung repair pathways by assessing the following **primary parameters** at different time points during/after an exacerbation:

- **Repair pathway / inflammatory gene profiles in the lung** (in alveolar epithelial lung progenitor cells)
- Lung organoid culture to investigate the effect of exacerbations on **organoid growth (e.g. number), morphology, differentiation and responses *ex vivo***.

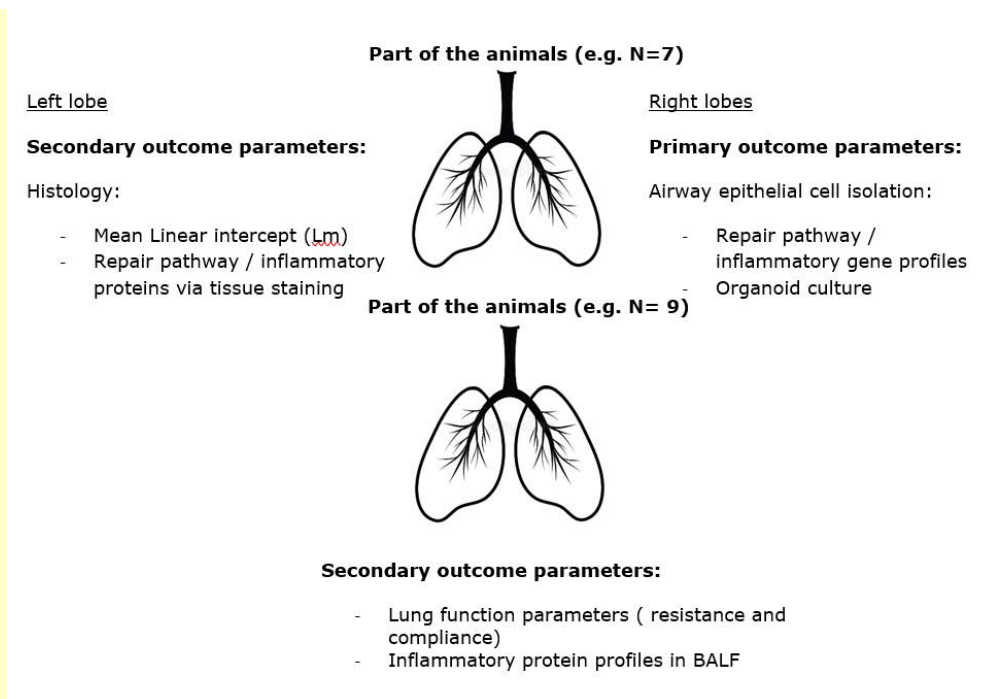


Figure 2. Primary and secondary outcome parameters

Part of the animals (e.g. N=7)

Half of the right long lobe will be processed and used for PCR analyses of related lung repair pathway/inflammatory gene profiles in epithelial lung progenitor cells to:

- 1) identify key genes and pathways activated by LPS/Poly I:C,
- 2) determine the impact of interaction of LPS/Poly I:C with cigarette smoke on inflammation and lung repair-associated gene expression, and
- 3) identify dynamics in gene expression during the induction and resolution phase using selected time points.

Initial PCR analyses will be directed at repair pathway, epithelial marker (which (sub)populations of epithelial stem/progenitor cells will be activated?), and pro-inflammatory target genes.

Examples of these target genes are:

- Lung repair: WNT signaling-related genes, like WNT2B, WNT5A, AXIN2,FRZB, growth factors, like FGF2, FGF7, FGF10 and Notch signaling-related genes, like JAG1.
- Inflammation: Pro-inflammatory cytokines, oxidative stress markers, like heme oxygenase

For a selected time point, based on the initial PCR data, RNAseq analyses will be conducted to establish the differential response signature associated with a background of cigarette smoke-induced inflammation.

The other half of the right long lobe lobes will be used for **organoid culture** to investigate the effect of exacerbations on lung organoid growth, morphology, differentiation and responses *ex vivo*. Lung regeneration is regulated by an initial cell division of an alveolar lung progenitor, followed by a phase of proliferative expansion and subsequent differentiation. The organoid model is perfectly suited to study these different phases of progenitor cell activation leading to differentiated lung tissue.

Secondary outcome parameters (Figure 2)

The left lung lobe will be used for **histology**:

- Prominent altered lung repair / inflammatory genes (observed in primary outcome parameters) will be validated at **protein level** in lung tissues with an immunohistological/immunofluorescence staining.
- the **mean linear intercept (Lm)** (measure for lung emphysema) will be determined.

Part of the animals (e.g. N=9)

It is crucial to measure a functional parameter within this study (*i.e.*, **Lung function**).

Lung function parameters will be measured prior to sacrificing the animals at the end of the experimental period using an EMKA lung function test. Lung function will be measured under intraperitoneal injection anaesthesia (0.1 ml; ketamine 125 mg/kg and medetomidine 0.2 mg/kg). Mice will be ventilated and receive accumulating concentrations of metacholine (MCh)

(0,37-25 mg/ml). Airway resistance and dynamic compliance will be measured as an average value of a 3 min period after receiving a concentration of MCh (aerosol; 10 sec; puff 10%) on each inhalation.

Measuring lung function will take 45 minutes, followed by sacrificing of mice to collect all further tissue/fluids of interest. Mice will be sacrificed according to the methods listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU.

In addition, **inflammatory cell and protein profiles in BALF** collected from these animals will be assessed to give an indication of the lung inflammation after an exacerbation.

Blood and other tissues will be sampled to investigate the systemic effects of COPD exacerbations and associated repair mechanisms.

References

1. Pelgrim CE, Wang L, Peralta Marzal LN, Korver S, van Ark I, Leusink-Muis T, Braber S, Folkerts G, Garssen J, van Helvoort A, Kraneveld AD. Increased exploration and hyperlocomotion in a cigarette smoke and LPS induced murine model of COPD: linking pulmonary and systemic inflammation with the brain. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2022 Jun 14. doi: 10.1152/ajplung.00485.2021.
2. Wang L, Pelgrim CE, Peralta Marzal LN, Korver S, van Ark I, Leusink-Muis T, van Helvoort A, Keshavarian A, Kraneveld AD, Garssen J, Henricks PAJ, Folkerts G, Braber S. Changes in intestinal homeostasis and immunity in a cigarette smoke- and LPS-induced murine model for COPD: the lung-gut axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2022 Jun 14. doi: 10.1152/ajplung.00486.2021.
3. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 2008; 359:2355-2365.

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

COPD exacerbation model (Phase 1)

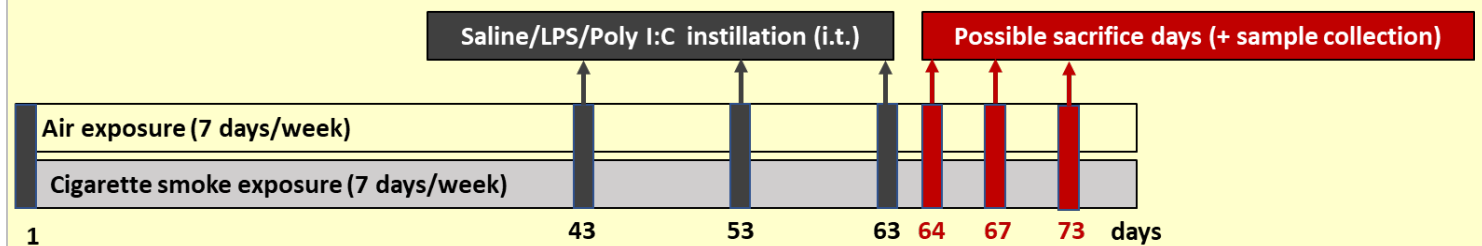


Figure 3. A mouse model of COPD exacerbations. Mice will be exposed to cigarette smoke for 7 days/week for 6 consecutive weeks followed by a timeframe of 3 x 10 days during which the animals will also receive an intratracheal saline, LPS or Poly I:C challenge (days 43, 53, 63; black arrows) to mimic a bacterial or viral exposure. Mice will be sacrificed at different time points (day 64, 67 and 73) following the last LPS or Poly I:C challenge (see red arrows).

COPD exacerbation model (Phase 4)

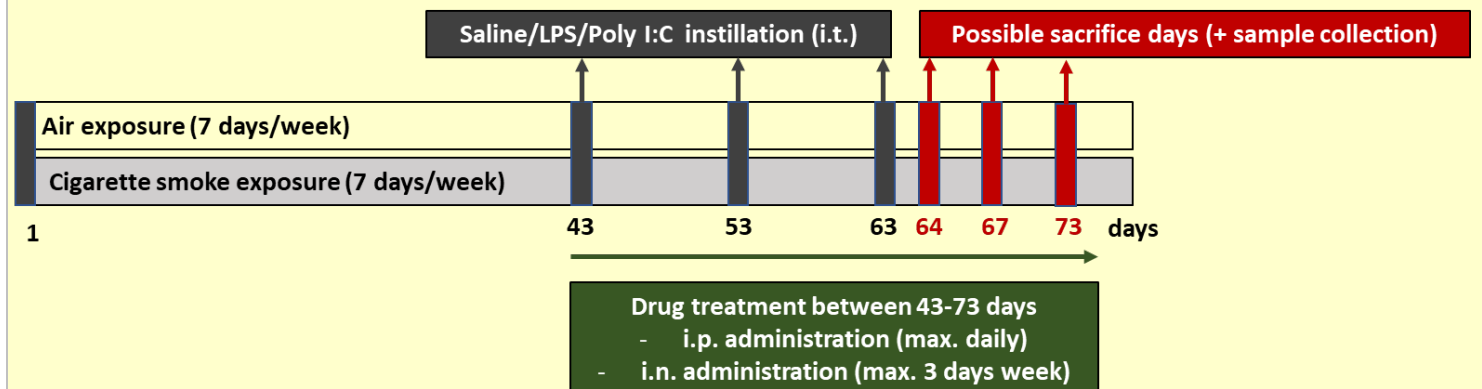


Figure 4. A mouse model of COPD exacerbations (as described in Figure 3). Mice will be exposed to cigarette smoke for 7 days/week for 6 consecutive weeks followed by a timeframe of 3 x 10 days during which the animals will also receive an intratracheal saline, LPS or Poly I:C challenge (days 43, 53, 63; black arrows) to mimic a bacterial or viral exposure. Depending on results from Phase 1, mice will be sacrificed at one of these different time points (day 64, 67 and 73) following the last LPS or Poly I:C challenge (see red arrows). Based on

results from Phase 1 and Phase 2 drug treatment will be tested in Phase 4. These compounds will be administered between the first LPS or Poly I:C trigger (day 43) till the end of the experiment (i.p. administration maximal daily and i.n. administration maximal 3 times/week), but the exact treatment regime will be determined in Phase 3 (and discussed with the IVD) based on the results obtained from Phase 1.

The outline of the COPD exacerbation models in Phase 1 and Phase 4 are presented in **Figure 3 and 4**, respectively.

Cigarette smoke exposure

Female Balb/c mice (8-10 weeks old) will be exposed to air or cigarette smoke in a whole-body chamber while freely moving. The whole body chamber can be divided into different parts and we will try as much as possible to put the animals from the same cage in the same part of the chamber, although we will rotate the place of the animals in the whole-body chamber regularly. No cage enrichment will be used in the whole-body chamber as this will disrupt the cigarette smoke exposure flow, which will lead to more variation in exposure per group/animal.

Cigarette smoke exposure will be gradually increased in the first week from 2x2 (day 1) to 4x2 (day 2), 5x2 (day 3), 6x2 (day 4), and 7x2 cigarettes (day 5). In weeks 2-10, animals will be exposed daily (7 days/week) to 7x2 cigarettes (maximal 45 min/day) (see **Figure 3** for the timeline).

3R4F Kentucky Reference cigarettes (Cooperation center for scientific research relative to tobacco; Kentucky; USA) will be used for smoke exposure. Carbon monoxide (CO), temperature, and oxygen (O₂) will be monitored during exposures, and will be adapted when deviating from optimal levels.

Induction of COPD exacerbation

After 42 days (6 weeks) of smoke exposure alone, we will start evoking pulmonary inflammation by an intratracheal instillation of a bacterial endotoxin (LPS) or a viral component (poly I:C) every ten days at three timepoints (d43, d53, d63, **Figure 3**); repeated provocation with LPS or Poly I:C mimics the human COPD condition, which is characterized by multiple exacerbations a year (4). The trigger agents will be administered intratracheally under short-duration inhalation anesthesia with isoflurane. Smoke exposure will continue during the exacerbation period until the final day of the experimental period. Our colleagues from Maastricht University, the Netherlands, published a murine exacerbation model, in which mice were intratracheally instilled with elastase to induce emphysema followed by three weekly instillations with LPS (7-days interval). (5). Based on the experience/knowledge of this study, we also used 3 repetitive LPS/Poly I:C treatments, but we increased the recovery period to 10 days to make sure that the mice recover from the exacerbation.

In addition, to select the dose of the LPS and Poly I:C trigger, we did a pilot study (partly published by Pelgrim et al., 2022; (6)) with different concentrations LPS and Poly I:C (based on literature) and measured the total BALF cell numbers 24 h after i.t. LPS or Poly I:C administration (see Figure 5). Thereafter, we choose 2 µg/mL LPS and 0.5 mg/ml Poly I:C, as we would like to have a clear but not too severe increase of inflammatory cells in the BALF (otherwise it might be too dangerous for the mice: cigarette smoke exposure + additional LPS triggers).

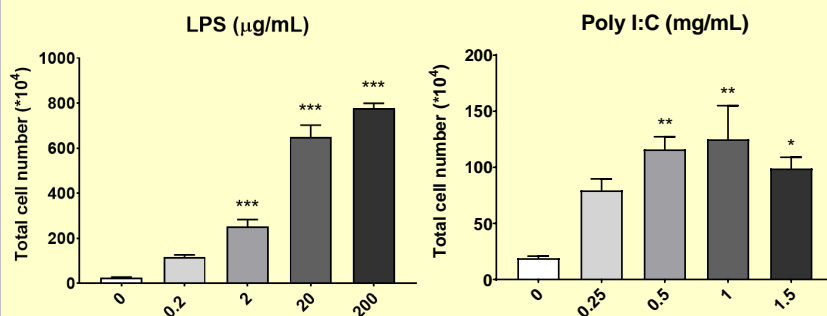


Figure 5. Total cell numbers in BALF 24h after a LPS or Poly I:C trigger. Data are presented as means \pm SEM. Asterisks above a group represent comparisons with the control group.

Sacrifice

Mice will then be euthanized for experiments at t = 1 (day 64), 4 (day 67) or 10 days (day 73) after the final (third) saline/LPS/Poly I:C exposure (**Figure 3**). Air-exposed mice with and without application of LPS/Poly I:C will serve as controls.

(Primary) outcome parameters will be assessed at 3 different time points after the last trigger challenge in the COPD exacerbation model:

- Days 64, 67 and 73

The first measurement takes place during an exacerbation (within 24h after the final LPS/Poly I:C administration) to examine the direct impact of the infectious triggers on primary outcomes in our model. Days 4 and 10 after the last trigger exposure are considered as the (post-)exacerbation and resolution phases, respectively. It is important to distinguish between these phases to evaluate the impact of time on the recovery process in the lungs after these exacerbations.

Treatment regime (novel target testing)

Depending on results from Phase 1, mice will be sacrificed at one of the different time points (day 64, 67 and 73) (See Figure 4) following the last LPS or Poly I:C challenge. Based on the results from Phase 1 and Phase 2 interesting drug targets will be tested in Phase 4. These compounds will be administered between the first LPS or Poly I:C trigger (day 43) till the end of the experiment (i.p. administration maximal daily and i.n. administration maximal 3 times/week) (Figure 4), but the exact treatment regime will be determined in Phase 3 (and discussed with the IVD) based on the results obtained from Phase 1.

References

4. Wilkinson TMA, Aris E, Bourne SC, Clarke SC, Peeters M, Pascal TG, Taddei L, Tuck AC, Kim VL, Ostridge KK, Staples KJ, Williams NP, Williams AP, Wootton SA, Devaster JM. Drivers of year-to-year variation in exacerbation frequency of COPD: analysis of the AERIS cohort. *ERJ Open Res.* 2019 Feb 25;5(1):00248-2018. doi: 10.1183/23120541.00248-2018. eCollection 2019 Feb.
5. Ceelen JJM, Schols AMWJ, Kneppers AEM, Rosenbrand RPHA, Drożdż MM, van Hoof SJ, de Theije CC, Kelders MCJM, Verhaegen F, Langen RCJ. Altered protein turnover signaling and myogenesis during impaired recovery of inflammation-induced muscle atrophy in emphysematous mice. *Sci Rep.* 2018 Jul 17;8(1):10761.
6. Pelgrim CE, van Ark I, Leusink-Muis T, Brans MAD, Braber S, Garssen J, van Helvoort A, Kraneveld AD, Folkerts G. Intratracheal administration of solutions in mice; development and validation of an optimized method with improved efficacy, reproducibility and accuracy. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2022 Mar-Apr;114:107156.

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

To secure sufficient power, we will need a minimum of 17 mice per treated group:

- N= 7 animals – right lung lobes for repair pathway / inflammatory **gene** profiles in the lung and lung organoid culture, and left lung lobe for histology (Lm measurement and repair pathway / inflammatory **protein** profiles via tissue staining).
- N= 9 animals - for *in vivo* lung function tests and assessment of inflammatory cell/protein profiles in collected BALF

The expected dropout rate, based on our experience with previous COPD (exacerbation models), will be about 2-3%, which leads to a group size of $16+1=17$ mice.

Gene and protein profiles + histology cannot be correctly evaluated in lung tissue after lavage for BALF collection (related to the mechanical strain inflicted during lavage), therefore 2 groups of animals are needed to assess all outcome parameters.

Proper controls (*i.e.*, air-exposed mice with and without application of LPS or Poly I:C) will be included to guarantee the quality of the model.

After **Phase 1**, we will include selection points with the purpose of minimizing the number of experimental groups in the following phase. Based on the outcomes of **Phase 1**, we will pick the ideal time point after the COPD exacerbation for evaluation of treatments/interventions in **Phase 4** (this will be carefully discussed within the consortium during **Phase 1**, see project proposal).

In addition, if the results in **Phase 1** are sufficiently reproducible, we may not need 17 animals in the control groups (*i.e.*, air- and smoke-exposed mice with and without application of LPS or Poly I:C) in **Phase 4**; we anticipate these numbers, which will be recalculated following **Phase 1**, can be markedly reduced.

Based on the generated knowledge from **Phase 1**, we will perform a power analysis using "PS Power and sample size calculation" in order to minimize the group sizes for the *in vivo* proof-of-concept studies (**Phase 4**). These power calculations will be discussed with and checked by a statistician.

However, in this appendix, the maximally anticipated number of animals needed has been calculated.

Sample size calculations:

One of the primary outcome parameters of this study is **organoid number (growth)**. This *ex vivo* organoid model, which is up-and running at the Rijksuniversiteit Groningen (one of our collaborators), is perfectly suited to study progenitor cell activation/growth leading to differentiated lung tissue.

Organoid number (growth)

t tests - Means: Difference between two independent means (two groups) – control and cigarette smoke exposure

Analysis: A priori: Compute required sample size
 Input: Tail(s) = One
 Effect size d = 1.52
 α err prob = 0.05
 Power (1- β err prob) = 0.8
 Allocation ratio N2/N1 = 1
 Output: Noncentrality parameter δ = 2.8436596
 Critical t = 1.7822876
 Df = 12
 Sample size group 1 = 7
 Sample size group 2 = 7
Total sample size = 14 (N=7/group)
 Actual power = 0.8492265

It is crucial to measure a functional parameter within this study to observe the functional changes after an exacerbation. The **airway responsiveness** (cm H₂O/ml/sec) is one of the most relevant clinical parameters related cigarette smoke exposure. The airway responsiveness will be measured at the end of the experiment and therefore, the animals will be exposed to increasing doses of metacholine aerosol. The following results show an estimate based on previous power calculations:

Airway responsiveness (resistance)

t tests – Means: Difference between two independent means (two groups) - control and cigarette smoke exposure

Analysis: A priori: Compute required sample size
 Input: Tail(s) = one
 Effect size f = 1.2928839
 α err prob = 0.05
 Power (1- β err prob) = 0.8
 Allocation ratio N2/N1 = 0.88888
 Output: Noncentrality parameter δ = 2.7256386
 Critical t = 1.7458837
 Df = 16
 Sample size group 1 = 9
 Sample size group 2 = 9
Total sample size = 18 (N=9/group)
 Actual power = 0.8321656

One-way/Two way ANOVA and multiple comparison post-hoc tests will be performed to determine whether the outcomes are significantly different ($p < 0.05$) between the experimental groups.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Mouse	Charles River	8-10 weeks old	2668	Female	No	Balb/c
2							

Provide justifications for these choices

Species	Mice
---------	------

Origin	Charles River is one of the registered laboratory animal suppliers (in addition to others like Jackson laboratories etc.), from whom we have ordered our Balb/C mice for previous COPD model experiments. Based on the outcomes of our previous studies, we prefer to be consistent and keep the same supplier.
Life stages	We will use 8-10 weeks old, young-adult, mice, the age (young-adult) when people usually start smoking. This choice is also similar to our previous studies using COPD models, allowing us to compare between studies. In addition, this COPD exacerbation model is reproducible using mice at this age.
Number	

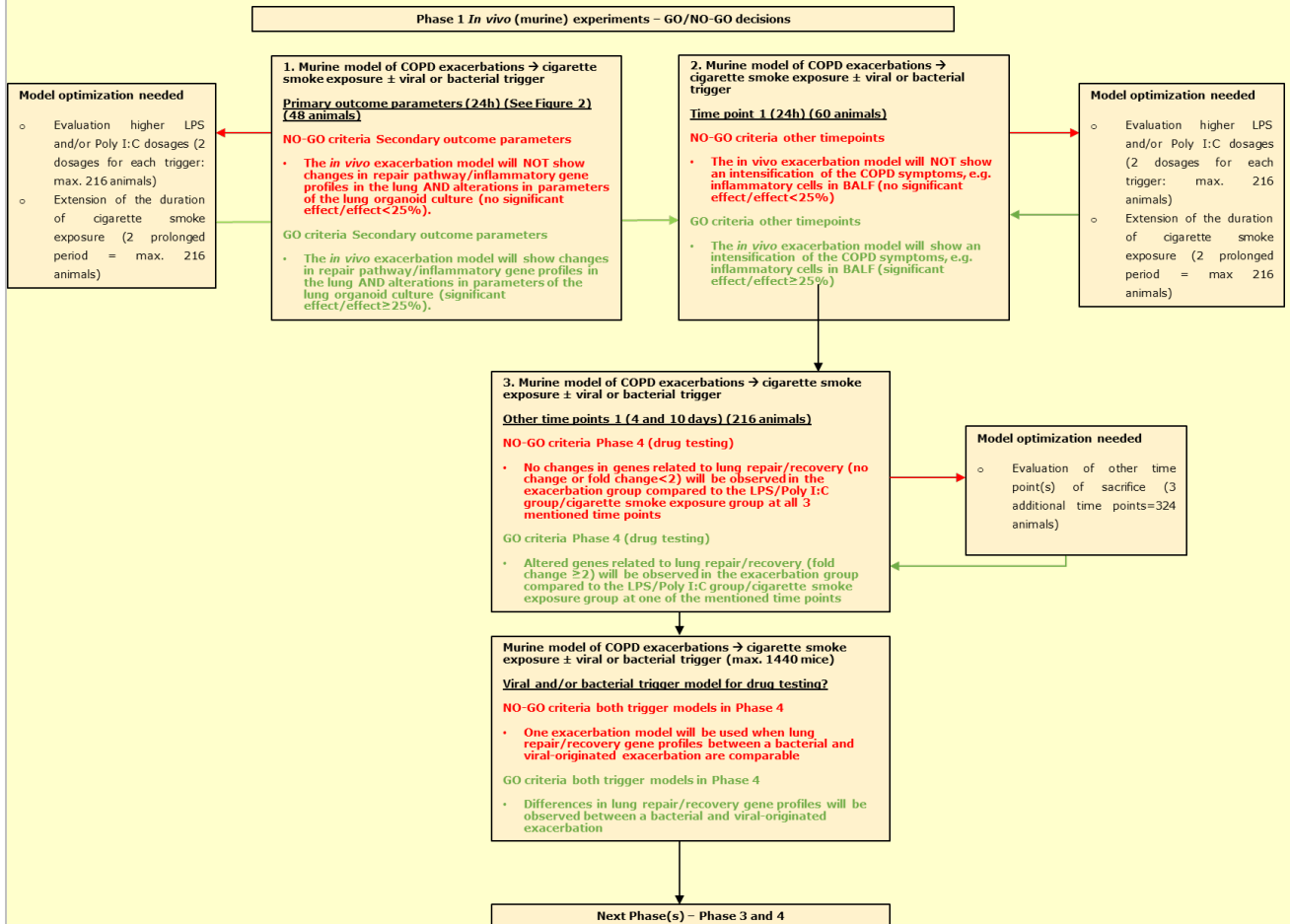


Figure 6. An overview of Phase 1 with decision moments and GO/NO-GO criteria.

**PHASE 1:
COPD exacerbation model**

- air + vehicle
- air + LPS
- air + Poly I:C
- smoke + vehicle
- smoke + LPS
- smoke + Poly I:C

The expected dropout rate, based on our experience with previous COPD (exacerbation models), will be about ± 2%.

As described above and Figure 2:

- N=7 needed for primary parameters (like organoid culture) → N=8 (2% dropout)
- N=9 needed for secondary parameters (like lung function) → N=10 (2% dropout)
- N=18 mice in total

To reduce the amount of animals, the first experiment will be divided in two parts:

1. First, we will run the groups with the primary outcome parameters and secondary parameters (N=7 in Figure 2):

Primary: Airway epithelial cell isolation:

- Repair pathway / inflammatory gene profiles
- Lung organoid culture

Secondary: Histology:

- Mean linear intercept
- Repair pathway / inflammatory proteins – staining

2. Secondly, we will run the groups with the secondary outcome parameters (e.g. N=9 in Figure 2):

Secondary:

- Lung function
- Inflammatory proteins in BALF

GO decision to continue with the secondary outcome parameters (Figure 2: lung function + BALF) (**Figure 6**):

- The *in vivo* exacerbation model will show changes in repair pathway/inflammatory gene profiles in the lung AND alterations in parameters of the lung organoid culture (significant effect/effect \geq 25%).

Then, we will sacrifice the animals for primary and secondary parameters → 48 animals (6 groups x N=8) + 60 animals (6 groups x N=10) = 108 animals

If **NO changes** in repair pathway/inflammatory gene profiles in the lung AND alterations in parameters of the lung organoid culture (no significant effect/effect $<$ 25%) will be observed → First start with model optimization:

- Evaluate higher LPS and/or Poly I:C dosages (max. 6 groups x 18 animals (N=8 + N=10) x 2 dosages) = 216 animals)
- Prolong the duration of cigarette smoke exposure (max. 6 groups x 18 animals x 2 prolonged periods) = 216 animals

NOTE: we will carry out these experiments step by step! Not all parameters will be measured at the same time (e.g. First, Secondary outcome parameters (model optimization), N=10 + 2% dropout, thereafter Primary outcome parameters, N=7 + 2% dropout, See Figure 2).

GO decision to continue with all 3 time points (**Figure 6**):

- The *in vivo* exacerbation model will show an intensification of the COPD symptoms (significant effect/effect \geq 25%), e.g. inflammatory cells in BALF (time point 1 → 24h after last exacerbation trigger).

Then, we will sacrifice the animals at 3 different time points and focus on lung repair parameters → 6 groups x 18 animals x 3 time points = 324 animals.

NO-GO decision to continue with all 3 time points (**Figure 6**):

- The *in vivo* exacerbation model will NOT show an intensification of the COPD symptoms (no significant effect/effect $<$ 25%), e.g. inflammatory cells in BALF (time point 1 → 24h after last exacerbation trigger).

Then model optimization is needed:

We will continue with the model optimization as described above:

- o Evaluate higher LPS and/or Poly I:C dosages
- o Prolong the duration of cigarette smoke exposure

Additional time points needed if (**Figure 6**):

- No significant altered genes related to lung repair/recovery (no change or fold change $<$ 2) will be observed in the exacerbation group compared to the LPS/Poly I:C group/cigarette smoke exposure group at all 3 mentioned time points
 - o other time point(s) of sacrifice will be evaluated ((max. 6 groups x 18 x 3 time points = 324 animals)

This amounts to a max. total of 1188 animals for PHASE 1.

GO criteria for Phase 4 (Figure 6)

- Significant altered lung repair pathway / inflammatory gene profiles (fold change \geq 2) following COPD exacerbations (specific time point(s)) + related (new) drug targets

- Both **bacterial** and **viral** exacerbation models will be used, when differences in gene profiles will be observed between a bacterial and viral-originated exacerbation

NO-GO criteria for Phase 4 (Figure 6)

- No significant altered lung repair pathway / inflammatory gene profiles following COPD exacerbations (no change or fold change < 2)
- One exacerbation model will be used when gene profiles between a bacterial and viral-originated exacerbation are comparable

PHASE 4:

COPD exacerbation model

- air + vehicle
- air + LPS
- air + LPS + DRUG dosage 1
- air + LPS + DRUG dosage 2
- smoke + vehicle
- smoke + LPS
- smoke + LPS + DRUG dosage 1
- smoke + LPS + DRUG dosage 2

- air + vehicle
- air + poly I:C
- air + Poly I:C + DRUG dosage 1
- air + Poly I:C + DRUG dosage 2
- smoke + vehicle
- smoke + Poly I:C
- smoke + Poly I:C + DRUG dosage 1
- smoke + Poly I:C + DRUG dosage 2

To secure sufficient power, we will need a minimum of N=18 mice per treated group (see above).

We will use LPS or Poly I:C as triggers, evaluate 2 different dosages of up to 5 promising identified drug targets, and compare these treatments in air- vs smoke-exposed animals.

That will lead to a maximum of → 8 groups x 18 animals x 2 triggers x 5 drug targets (max feasible amount in this time span) = 1440 animals (based on 1 time point)

NOTE: we will carry out these experiments step by step! Not all parameters will be measured at the same time (e.g. First, Primary outcome parameters, N=7 + 2% dropout, thereafter Secondary outcome parameters (model optimization), N=9 + 2% dropout, See Figure 2).

Max. amount of animals needed for PHASE 1 and PHASE 4 = 1188 + 1440 = 2628 mice

Animals for training purposes

The PhD student and post doc working on the project need to be trained for intratracheal instillation and cannulation (BALF and histology samples) – 20 animals/pp = **40 mice**

Max. total amount of animals needed:

2628 mice + 40 mice = 2668 mice

Gender	Animal experiments will be carried out with 8-10 weeks old Balb/c female mice, obtained from a registered breeding company. The main reason for choosing female mice is that there is a high risk that male mice will be aggressive toward each other, especially considering the experiments will take place over an extended period of time (ten weeks). Indeed, in previous experiments with male mice, we observed aggression after longer periods of housing. With female mice, this issue was not observed at all. Thus, to avoid solitary housing and dropouts because of fighting, female mice will be used.
Genetic alterations	The mice are not genetically-modified/alterred.
Strain	We have extensive experience with the Balb/c strain and previously used these mice for smoke models (1,2). This strain exhibits higher influx of neutrophils in the lungs after cigarette smoke exposure (5) compared to other strains. The neutrophilic influx in the airways is an important hallmark of COPD.

Reference

5. Morris A, Kinnear G, Wan WY, Wyss D, Bahra P and Stevenson CS. Comparison of cigarette smoke induced acute inflammation in multiple strains of mice and the effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on these responses. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 327:3:851-862, 2008.

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

Click or tap here to enter text.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

Click or tap here to enter text.

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

The triggers (LPS and Poly I:C) will be administered intratracheally under short-duration inhalation anaesthesia with isoflurane.

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

Dyspnea may occur as a result from the model (e.g., due to exposure to smoke + triggers). Dyspnea is common in COPD patients as well.

Immediately after smoking, mice will experience dizziness and the fur may appear messy (less than 1 hour). In addition, mice will experience some stress from both the smoke exposure procedure and the anesthesia (needed for instillation of triggers).

Explain why these effects may emerge.

Smoke exposure leads to widespread lung damage and inflammation, thereby increasing the respiratory rate comparable to the human situation in COPD. These effects are most likely aggravated after every infectious trigger exposure. Stress may result from handling and exposure to anesthesia.

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

Cigarette smoke exposure and other treatments/procedures are carried out by an experienced researcher.

Exposure to cigarette smoke is continuously monitored (approx. 300ppm; oxygen >20%).

Body weight of the animals will be closely monitored by weighing them every other day during the first two weeks of the experiment and during trigger exposure. Mice will be weighed once per week after the first two weeks until the first trigger exposure unless there are indications of discomfort (e.g., excessive weight loss or piloerection not directly related to smoke exposure). In these cases, we will monitor body weight every day for five days/week until the situation has normalized.

E. 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 F

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

- If animals lose more than 15% of their weight within a period of two days.
- If mice have sustained piloerection together with depressed mobility and breathing problems, which will not improve after 1 hour.
- Labored breathing (shortness of breath) in combination with a bulb seated posture, cyanosis will be monitored.

We will observe mice regularly (every day for five days/week in the first two weeks and during trigger exposure); if there is an indication for sustained suffering (as mentioned above), the affected animal(s) will be removed from the experiment and sacrificed according to the methods described in Annex IV of Directive 2010/63/EU.

It should be noted that in previous experiments using this *in vivo* model no severe discomfort was observed.

Indicate the likely incidence.

Sub-chronic smoke exposure model: $\pm 2\%$ dropout level, but due to unforeseen circumstances and not directly linked to the humane endpoints described above.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Group	Procedure	Frequency/duration	Discomfort level	Cumulative discomfort
Air	Air exposure (different housing)	Max. 72 days - 45min/day	mild	
Air	Intratracheal instillation to triggers under anesthesia	Max. 3 times – 3 min	Mild (saline), moderate (triggers)	
Air	Sacrifice and sample collection	Max 1- max 3 sec	mild	
Air \pm triggers				MILD
Smoke	Different housing during smoke exposure	Max. 72 days - 45min/day	Mild	
Smoke	Smoke exposure (housing)	Max. 72 days - 45min/day	Moderate	
Smoke	Intratracheal instillation to triggers under anesthesia	Max. 3 times – 3 min	Mild (saline), moderate (triggers)	
Smoke	Sacrifice and sample collection	Max 1- max 3 sec	mild	
Smoke \pm triggers				Moderate
Air + Drug treatment	i.p. or i.n.	i.p. max. daily from day 43-73 i.n. max 3/week from day 43-73	Mild-Moderate	Moderate
Smoke + Drug treatment		i.p. max. daily from day 43-73 i.n. max 3/week from day 43-73	Mild-Moderate	Moderate
Animals for training purposes	Intratracheal instillation (saline)	Max 3 times (divided over 7 days)	Mild	
Animals for training purposes	Sacrifice and cannulation	Max 1- max 3 sec	Mild	
Animals for training purposes				Mild

Based on the Table above:

Cumulative discomfort:

- Mild = 36% (961 animals)
- Moderate=62% (1654 animals)
- Severe = 2% (53 animals) – unforeseen circumstances (e.g. sudden death)

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement . In this Longfonds project, there is a unique translational approach as different *in vitro*, *in vivo*, and clinical experiments are implemented. After obtaining results from the *in vitro*, *in vivo* and clinical experiments, we will evaluate the translatability of the *in vitro/in vivo* models, to examine whether we can replace/reduce the

	<i>in vivo</i> experiments in the future. In conclusion, the outcomes of these studies may lead to the replacement, reduction, and refinement of animal experimentation in future COPD research.
Reduction	Within our department, we have experience with the COPD exacerbation mouse models and the techniques that will be applied in this study. The likelihood of dropouts will be reduced by this experience. We also recently published 3 papers with the sub-chronic exacerbation model (1,2). After measuring and analysing the COPD exacerbation models, we will use "PS Power and sample size calculation" in order to minimize group sizes in the upcoming experiments. Furthermore, based on our findings in PHASE 1, we will select one time point to sacrifice animals and probably use less animals in the control groups in PHASE 4. In addition, we will only use one exacerbation model (cigarette smoke exposure + LPS triggers, OR cigarette smoke exposure + Poly I:C triggers) when lung repair/recovery gene profiles between a bacterial and viral-originated exacerbation are comparable. We will carry out the <i>in vivo</i> experiments step by step! Not all parameters will be measured at the same time (e.g. First, Primary outcome parameters, N=7 + 2% dropout, thereafter Secondary outcome parameters (model optimization), N=9 + 2% dropout (See Figure 2). This will all reduce the required number of groups/animals.
Refinement	Only experienced personnel will carry out both the intratracheal instillations (triggers), drug treatments and cigarette smoke exposure. The use of mice for COPD modelling has been generally accepted in the literature. Several techniques to measure immune and respiratory parameters in mice have been initialized and optimized within our department. In addition, surplus mice will be used for training purposes, which will help reduce the chance of (future) dropouts. Prior to the cigarette smoke exposure period, mice will be allowed to acclimatize to the cigarette smoke (or air) exposure procedure (room, boxes, handling, etc). To prevent that the cigarette smoke-exposed mice suffer from withdrawal symptoms, the mice will be exposed daily to cigarette smoke (7 days/week).

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

[Click or tap here to enter text.](#)

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable.

J. 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 K.

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

3. End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

[Click or tap here to enter text.](#)

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

Post-mortem research and organ isolation is needed to answer our research questions. Essential measurements can be carried out with the animal material in order to advance our understanding of the biological mechanisms involved in dysfunctional/incomplete lung repair following an exacerbation and to understand why this is inadequate in COPD.

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.

[Click or tap here to enter text.](#)

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

After anesthesia with ketamine-dexmedetomidine, mice will be euthanized by maximal blood collection from a cardiac puncture.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.



v

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 the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website <http://www.centralecommissiedierproeven.nl>.
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10800
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Utrecht University
1.3 Provide the title of the project.	COPD exacerbations as a therapeutic window for lung repair?

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic research
	<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
	<input type="checkbox"/> Regulatory use or routine production
	<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal
	<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
	<input type="checkbox"/> Higher education or training
	<input type="checkbox"/> Forensic enquiries
	<input type="checkbox"/> 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 2.1.

Background

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) constitutes one of the most common lung diseases in the world and is typically caused by exposure to tobacco smoke (\pm 90% of the COPD patients), fumes from in-house cooking, and/or air pollution. It should be noted that the persistent lung inflammation observed in COPD patients that continue to smoke also persists in ex-smokers with COPD (29,30).

COPD causes 6% of all deaths (www.who.int) and the disease prevalence is still increasing, currently affecting over 200 million people globally. COPD is the third leading cause of death in westernized countries (1).

The total annual cost of COPD in Europe amounts to €38.7 billion (including €4.7 billion for ambulatory care, €2.7 billion for medication, and €2.9 billion for in-patient care) with a total of 28.5 million work/productivity days lost (erswhitebook.org/).

The key problem underlying COPD pathogenesis is increased tissue destruction in combination with abnormal tissue repair, causing bronchitis and small airway remodelling on the one hand and emphysema on the other. Consequently, the disease process is characterized by a combination of airflow obstruction (that is not fully reversible) and progressive loss of lung function (1).

COPD patients, especially those with severe disease, suffer from recurrent and severe viral as well as bacterial infections that directly trigger disease exacerbations. COPD exacerbations are associated with a high burden on healthcare resources. Moreover, with each exacerbation event the patient's health status declines substantially, as does lung function. Almost 70% of patients hospitalized with an exacerbation will be re-hospitalized within 24 months and about 15% of patients die within two years (2).

Problem

Current therapies can improve symptoms and exacerbation frequency to some extent but do not modify the (progressive) course of the disease, as they do not reduce or prevent the rate of decline in lung function (e.g., by boosting tissue repair processes) (3). In fact, over the past 20 years, only 1 new drug class (PDE4 inhibitors) has been added to the portfolio of therapeutics available for the management of COPD, and its effectiveness is limited (4). Unless the abnormal interplay between inflammatory and repair processes can be halted or reversed, the outlook for patients with access to only non-curative, poorly effective treatments for the rest of their lives remains poor. Thus, there is an urgent need for the development of effective therapeutic strategies focusing on disease reversal and prevention of progressive lung damage, rather than management; this requires preclinical experimentation and innovative approaches.

Solution: The exacerbation period as a key window of opportunity for lung repair

As indicated, a disease hallmark in many patients is the occurrence of **frequent exacerbations**. Exacerbations are associated with increased airway and systemic inflammation and physiological changes. Exacerbations are predominantly triggered by infections of bacterial and/or viral origin, which leads to increased airway inflammation (5, 24). Human rhinovirus is the most frequently detected virus during exacerbations of COPD, along with influenza virus and respiratory syncytial virus, while the presence of potential pathogenic bacteria, most frequently *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis*, has been reported in sputum cultures during a COPD exacerbation (5, 23).

An exacerbation of COPD is characterized by a change in baseline dyspnoea, cough, and/or sputum production, that is acute in onset and warrants therapeutic intervention beyond the regular maintenance medication (3). Problematically, exacerbations do not only represent periods of increased complaints, but also lead to loss of quality of life, which is fundamentally related to impaired lung function. It is a relatively new understanding that progressive lung function decline in COPD is not linear but rather episodic in nature due to incomplete recovery from loss of function during an exacerbation (Figure 1). In fact, exacerbations are estimated to account for the majority (>50%) of accelerated lung function loss throughout the life of a COPD patient (6).

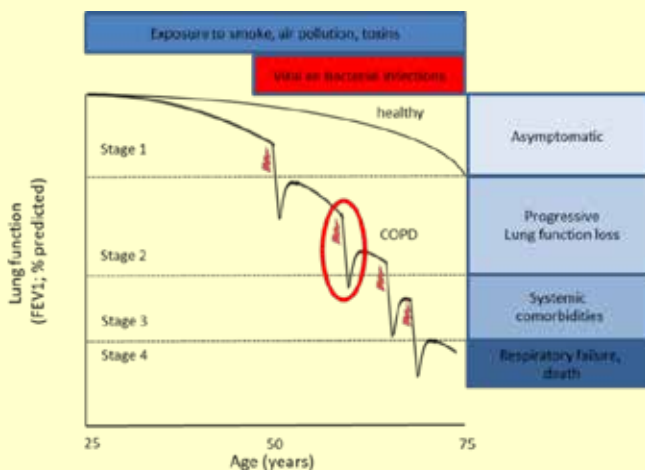


Figure 1. Lung function loss in COPD. Lung function loss in COPD is no longer viewed as a gradual decline but rather as an intermittent process driven by episodes of disease worsening (exacerbations). These episodes are often associated with bacterial and/or viral infections and represent opportunities for targeted pharmacological treatment.

Paradoxically, in the healthy lung, bacterial and viral infections will trigger large-scale activation of alveolar epithelial progenitors to help recover from (severe) lung injury (7-9). In COPD, this recovery phase is present but incomplete, rendering a net drop in lung function (10). Thus, the exacerbation is a period characterized by both concentrated disease burden and simultaneous repair pathway activation.

Therefore, **we hypothesize that the exacerbation period represents a key window of opportunity to promote lung repair.** We hypothesize that exposure to a bacterial/viral stimulus leads to an inflammatory response, which under normal circumstances would aid repair. However, in the presence of a background of cigarette smoke-induced inflammation, we hypothesize that the lung repair response to bacterial/viral exposure is impaired. Furthermore, the relatively defined period of (the aftermath of) an exacerbation allows for more unconventional therapeutics that are not necessarily suitable for long-term maintenance treatment but specifically aimed at preventing/reversing disease progress.

Interactions between inflammation and repair following an exacerbation

COPD exacerbations associated with bacterial or viral infections often drive severe inflammation (11,12). In the healthy lung, such infections will normally trigger activation of epithelial progenitors to promote recovery from (severe) lung injury (7-9). As indicated, in COPD this recovery phase is incomplete and results in a net reduction in lung function (6). There is evidence to support the hypothesis that specific mechanisms exist that link persistent inflammation in COPD to dysfunctional lung repair following an exacerbation (Figure 2). For example:

- First of all, in COPD, there is a background of persistent inflammation that facilitates Toll-like receptor (TLR) and NLRP3 inflammasome-mediated activation of the innate immune response (13, 25)(Figure 2). For example, a relationship between overexpression of TLR4, bacterial load and bronchial inflammation exists in bronchial biopsies of severe COPD patients (26). Interestingly, a recent paper showed that prolonged NLRP3 inflammasome activation caused injury and aberrant lung epithelial regeneration (27).
- The persistent presence of inflammatory cells that secrete proteolytic enzymes and reactive oxygen species ultimately leads to destruction of the alveolar walls (emphysema) (14).
- In the COPD lung, tertiary lymphoid structures that contribute to the persistent inflammatory response develop (15). Lymphotoxin- β (LT β), released from CD8+ T-cells in COPD, can inhibit repair. LT β induces noncanonical NF κ B signaling, thereby repressing functional Wnt/ β -catenin signaling in the lung (16).
- Factors that support resolution of inflammation and repair are reduced in COPD. For example, we observed that prostaglandins E2 (PGE2) and I2 (PGI2) support lung repair of epithelial progenitors, both *in vitro* and *in vivo*. However, in COPD and in response to cigarette smoke, prostaglandin synthase (PTGES2) and the PGI2 receptor (PTGIR) are downregulated. Exogenous PGE2 and PGI2 restored this defect (11).

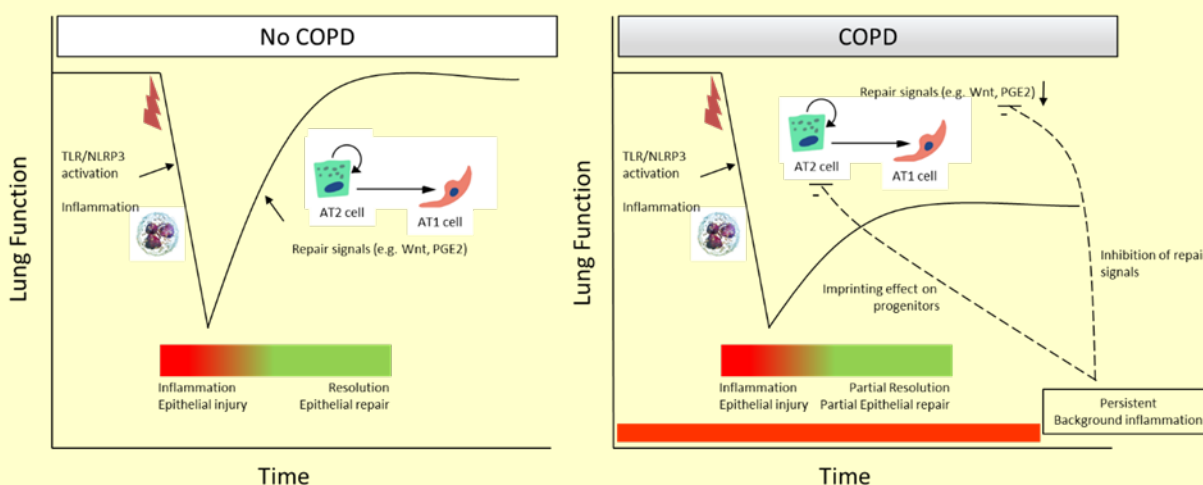


Figure 2. Hypothesis. In otherwise healthy subjects without COPD (left panel), bacterial or viral infections will trigger inflammation and a drop in lung function via TLR/NLRP3 signaling; this is followed by a resolution phase during which epithelial injury is repaired by signals such as Wnt and prostaglandin E2 (PGE2). Large-scale activation of alveolar epithelial progenitors will help recovery from (severe) lung injury. Alveolar type II (AT2) cells, considered as one of the dominant progenitor cell populations, function as local progenitors to maintain the alveolar epithelium and differentiate into alveolar type I (AT1) cells

(8). In COPD patients (right panel), lung function recovery is incomplete. We propose that a background of persistent inflammation interferes with repair signals (WP1/WP2) and/or negatively imprints on epithelial progenitors, like AT2 cells, leading to incomplete repair. Interfering with these pathways may restore the defect(s) and preserve lung function.

Lung regeneration

Traditionally, it was thought that the adult human lung was unable to regenerate. This view has been challenged since the emergence of case reports showing lung regeneration after surgical resection (17). The cellular and molecular mechanisms of adult lung regeneration are incompletely understood, but recent studies using animal models have revealed stem/progenitor cell populations located throughout the lung capable of responding to injury and repairing damaged tissue (18,19). Our recently published findings demonstrate that *in vivo* cigarette smoke exposure distorts the functionality of alveolar epithelial progenitors concomitantly with the induction of transcriptional changes in pathways critical to cellular homeostasis, cell proliferation, and inflammation (11).

References

- (1)Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol* 2009; 4:435-459
- (2)Mullerova H, Maselli DJ, Locantore N, Vestbo J, Hurst JR, Wedzicha JA, et al. Hospitalized exacerbations of COPD: risk factors and outcomes in the ECLIPSE cohort. *Chest* 2015; 147:999-1007.
- (3)Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. *Eur Respir J* 2017; 49: 1700214.
- (4)Durham AL, Caramori G, Chung KF, Adcock IM. Targeted anti-inflammatory therapeutics in asthma and chronic obstructive lung disease. *Transl Res* 2016; 167:192-203.
- (5)Wedzicha JA, Seemungal TA. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet* 2007; 370:786-796.
- (6)Hillas G, Perlikos F, Tzanakis N. Acute exacerbation of COPD: is it the "stroke of the lungs"? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2016; 11:1579-1586.
- (7)Kumar PA, Hu Y, Yamamoto Y, Hoe NB, Wei TS, Mu D, et al. Distal airway stem cells yield alveoli *in vitro* and during lung regeneration following H1N1 influenza infection. *Cell* 2011; 147:525-538.
- (8)Ray S, Chiba N, Yao C, Guan X, McConnell AM, Brockway B, et al. Rare SOX2(+) Airway Progenitor Cells Generate KRT5(+) Cells that Repopulate Damaged Alveolar Parenchyma following Influenza Virus Infection. *Stem Cell Reports* 2016; 7:817-825.
- (9)Vaughan AE, Brumwell AN, Xi Y, Gotts JE, Brownfield DG, Treutlein B, et al. Lineage-negative progenitors mobilize to regenerate lung epithelium after major injury. *Nature* 2015; 517:621-625.
- (10)Cazzola M, Rogliani P, Stolz D, Matera MG. Pharmacological treatment and current controversies in COPD. *F1000Res* 2019; 8:10.12688/f1000research.19811.1.
- (11)Wu X, Bos IST, Conlon TM, Ansari M, Verschut V, Gosens R, et al. A transcriptomics-guided drug target discovery strategy identifies novel receptor ligands for lung regeneration. *Sci Adv* 2021.
- (12)Jafarnejad H, Moghooei M, Mostafaei S, Salimian J, Azimzadeh Jamalkandi S, Ahmadi A. Worldwide prevalence of viral infection in AECOPD patients: A meta-analysis. *Microb Pathog* 2017; 113:190-196.
- (13)Li Zuo, Kurt Lucas, Christopher A. Fortuna, Chia-Chen Chuang, and Thomas M. Best. Molecular Regulation of Toll-like Receptors in Asthma and COPD *Front Physiol.* 2015; 6: 312.
- (14)Sapey E, Bafadhel M, Bolton CE, Wilkinson T, Hurst JR, Quint JK. Building toolkits for COPD exacerbations: lessons from the past and present. *Thorax* 2019; 74:898-905.
- (15)van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, Hylkema MN, van den Berg A, Timens W, Kerstjens HA. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Apr 1;173(7):751-8. doi: 10.1164/rccm.200504-594OC. Epub 2006 Jan 6.
- (16)Conlon TM, John-Schuster G, Heide D, Pfister D, Lehmann M, Hu Y, et al. Inhibition of LTbetaR signalling activates WNT-induced regeneration in lung. *Nature* 2020. Dec;588(7836):151-156.
- (17)Butler JP, Loring SH, Patz S, Tsuda A, Yablonskiy DA, Mentzer SJ. Evidence for adult lung growth in humans. *N Engl J Med* 2012; 367:244-247.
- (18)Hogan BL, Barkauskas CE, Chapman HA, Epstein JA, Jain R, Hsia CC, et al. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell* 2014; 15:123-138.
- (19)Rock J, Konigshoff M. Endogenous lung regeneration: potential and limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:1213-1219.
- (20)Pelgrim CE, Wang L, Peralta Marzal LN, Korver S, van Ark I, Leusink-Muis T, Braber S, Folkerts G, Garssen J, van Helvoort A, Kraneveld AD. Increased exploration and hyperlocomotion in a cigarette smoke and LPS induced murine model of COPD: linking pulmonary and systemic inflammation with the brain. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2022 Jun 14. doi: 10.1152/ajplung.00485.2021. Online ahead of print.PMID: 35699308
- (21)Wang L, Pelgrim CE, Peralta Marzal LN, Korver S, van Ark I, Leusink-Muis T, van Helvoort A, Keshavarian A, Kraneveld AD, Garssen J, Henricks PAJ, Folkerts G, Braber S. Changes in intestinal homeostasis and immunity in a cigarette smoke- and LPS-induced murine model for COPD: the lung-gut axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2022 Jun 14. doi: 10.1152/ajplung.00486.2021.
- (22) Maria C Basil, Fabian L Cardenas-Diaz, Jaymin J Kathiriya, Michael P Morley, Justine Carl, Alexis N Brumwell, Jeremy Katzen, Katherine J Slovik, Apoorva Babu, Su Zhou, Madison M Krempe, Katherine B McCauley, Shanru Li, Joseph D Planer, Shah S Hussain, Xiaoming Liu, Rebecca Windmueller, Yun Ying, Kathleen M Stewart, Michelle Oyster, Jason D Christie, Joshua M Diamond, John F Engelhardt, Edward Cantu, Steven M Rowe, Darrell N Kotton, Harold A Chapman, Edward E Morrissey. Human distal airways contain a multipotent secretory cell that can regenerate alveoli. *Nature.* 2022 Apr;604(7904):120-126. doi: 10.1038/s41586-022-04552-0. Epub 2022 Mar 30.
- (23) Antonio Anzueto, Marc Miravittles, Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations: A Need for Action *Am J Med.* 2018 Sep; 131(9S): 15-22. doi: 10.1016/j.amjmed.2018.05.003. Epub 2018 May 17.
- (24) Andrew I Ritchie, Jadwiga A Wedzicha, Definition, Causes, Pathogenesis, and Consequences of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations. *Clin Chest Med.* 2020 Sep; 41(3):421-438. doi: 10.1016/j.ccm.2020.06.007.

- (25) Yaxin Wu, Xin Di, Min Zhao, Haoran Li, Li Bai, Ke Wang. The role of the NLRP3 inflammasome in chronic inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Immun Inflamm Dis.* 2022 Dec; 10(12):e750.
- (26) Antonino Di Stefano, Fabio L M Ricciardolo, Gaetano Caramori, Ian M Adcock, Kian Fan Chung, Peter J Barnes, Paola Brun, Andrea Leonardi, Filippo Andò, Davide Vallese, Isabella Gnemmi, Luisella Righi, Francesco Cappello, Bruno Balbi. Bronchial inflammation and bacterial load in stable COPD is associated with TLR4 overexpression. *Eur Respir J.* 2017 May 23; 49(5):1602006.
- (27) Hong Zhou 1, Qun Zhang 1, Wen Huang 1, Shulan Zhou 1, Yanli Wang 1, Xiaoning Zeng 1, Hong Wang 1, Weiping Xie 1, Hui Kong. NLRP3 Inflammasome Mediates Silica-induced Lung Epithelial Injury and Aberrant Regeneration in Lung Stem/Progenitor Cell-derived Organotypic Models. *Int J Biol Sci.* 2023 Mar 21; 19(6):1875-1893.
- (28) Maria C. Basil, Fabian L. Cardenas-Diaz, Jaymin J. Kathiriya, Michael P. Morley, Justine Carl, Alexis N. Brumwell, Jeremy Katzen, Katherine J. Slovik, Apoorva Babu, Su Zhou, Madison M. Kremp, Katherine B. McCauley, Shanru Li, Joseph D. Planer, Shah S. Hussain, Xiaoming Liu, Rebecca Windmueller, Yun Ying, Kathleen M. Stewart, Michelle Oyster, Jason D. Christie, Joshua M. Diamond, John F. Engelhardt, Edward Cantu, Steven M. Rowe, Darrell N. Kotton, Harold A. Chapman, and Edward E. Morrisey. Human distal airways contain a multipotent secretory cell that can regenerate alveoli. *Nature.* 2022 Apr; 604(7904): 120–126.
- (29) E. Gamble, D. C. Grootendorst, K. Hattotuwa, T. O'Shaughnessy, F. S. F. Ram, Y. Qiu, J. Zhu, A. M. Vignola, C. Kroegel, F. Morell, I. D. Pavord, K. F. Rabe, P. K. Jeffery, N. C. Barnes. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis *European Respiratory Journal* 2007 30: 467-471.
- (30) Marina Miller, Jae Youn Cho, Alexa Pham, Paul J Friedman, Joe Ramsdell, David H Broide. Persistent airway inflammation and emphysema progression on CT scan in ex-smokers observed for 4 years. *Chest.* 2011 Jun; 139(6):1380-1387.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

Hypothesis:

We hypothesize that the pathological events surrounding an exacerbation are key to defective tissue repair in COPD, and that therapeutically targeting this window of opportunity may lead to the development of unconventional and novel disease treatment strategies; the research required and proposed will identify which signaling pathways are target candidates to promote tissue repair.

It is our ambition to break the current impasse in innovative pharmacological COPD research by designing and performing mechanistic as well as therapeutic studies specifically focused on the exacerbation period (Figure 2).

The ability to (re)activate lung repair by pharmacological targeting will have considerable potential because it can be applied on a relatively large scale and used to halt disease progress at an early stage resulting in real disease-modifying treatment. In addition, our pharmacological approach targeting specific signalling events associated with lung repair may promote or support regenerative strategies involving stem cells.

Overall aim of the project:

We aim to advance our understanding of the biological mechanisms underpinning dysfunctional lung repair following an exacerbation, to identify why repair is inadequate in COPD, and to provide *in vivo* proof-of-concept that the exacerbation period represents a promising therapeutic window for regenerative pharmacological intervention to promote lung repair.

Key objectives:

We will use a mix of *in vitro*, *in vivo* studies and clinical sample databases to understand the regenerative biology and differential patient biology associated with and following exacerbations. Using this knowledge, we will identify novel therapeutic targets to boost lung repair following an exacerbation. We will evaluate the regenerative efficacy of novel targets (max. 5) along with our previously identified target (████) in the context of the exacerbation period.

Subobjectives/research questions:

Phase 0: *In vitro* proof-of-concept (separate project at Rijksuniversiteit Groningen (RUG) - TKI LSHM22013 grant)

The *in vitro* experiments with lung organoids obtained from lung tissues of healthy subjects and COPD patients ± pro-inflammatory cytokines ± viral/bacterial trigger:

Objective:

To characterize the imprinting effect of the pro-inflammatory environment on epithelial progenitors

Research question:

Can (low-grade) persistent inflammation impair the repair response to a subsequent exacerbation stimulus (like a bacterial or viral trigger)?

Primary outcome parameters:

Organoid growth, morphology and differentiation (immunofluorescence, gene expression profiles)

Phase 1: *In vivo* model (Longfonds project/conducted at Utrecht University (UU) – DEC proposal)

Murine model of COPD exacerbations à cigarette smoke exposure ± viral/bacterial trigger

Objective:

To characterize the incomplete/insufficient lung tissue repair processes following an exacerbation

Research questions:

- Why are lung tissue repair processes incomplete/insufficient following an exacerbation?
- How can cigarette smoke-induced inflammation impact the repair processes following an exacerbation?
- Which time point/period after the exacerbation is most suitable to achieve recovery from lung injury?

Primary outcome parameters (see also appendix 1):

Dynamic changes in activation of lung repair pathways at different time points during/after an exacerbation by assessing:

- Repair pathway / inflammatory gene profiles in the lung (in epithelial lung progenitor cells)
- Lung organoids obtained from lung tissue of COPD exacerbation and control mice à organoid growth, morphology and differentiation (immunofluorescence, gene expression profiles)

Phase 2 Clinical samples (Longfonds project/ conducted at University Medical Centre Groningen (UMCG))

Nasal brushings and sputum from COPD patients during an exacerbation and at stable state have been obtained

Objective:

To characterize the incomplete/insufficient lung tissue repair processes following an exacerbation

Research question:

What are the altered gene expression profiles related to lung tissue repair and inflammation during and following a COPD exacerbation?

Primary outcome parameters:

Repair pathway / inflammatory gene profiles in nasal brushings and sputum (nasal epithelial cells and inflammatory cells, respectively)

Phase 3 Drug Target discussion and decision

Objective:

Evaluating the transability of the *in vitro/in vivo* models and testing promising (new) drug targets in the *in vitro* model + final decision which drug targets to be used in Phase 4.

Research questions:

- Are the results of the *in vitro* model translational to/consistent with the results of the *in vivo* model?
- Are the results of the *in vitro* and *in vivo* models translational to/consistent with the clinical sample evaluation?
- Are the promising drug targets effective in the *in vitro* model described in Phase 0?
- Which targets to be used in Phase 4 and which time point (+duration) to start therapy to support repair mechanisms after exacerbations?

Primary outcome parameters:

See primary outcome parameters previous phases

Phase 4 *In vivo* proof-of-concept (Longfonds project/conducted at Utrecht University (UU) – DEC proposal)

Murine model of COPD exacerbations à cigarette smoke exposure ± viral/bacterial trigger (see phase 1)

Objective:

In vivo proof-of-concept for the functional efficacy of novel targets in supporting repair mechanisms after exacerbations

Research question:

Can our previously [redacted] and newly (outcomes from Phase 1 and 2) identified target(s) therapeutically correct the defect(s) to accelerate endogenous lung tissue repair?

Primary outcome parameters:

- Repair pathway / inflammatory gene profiles in the lung (in epithelial lung progenitor cells)
- Lung organoids obtained from lung tissue of COPD exacerbation and control mice à organoid growth, morphology and differentiation (immunofluorescence, gene expression profiles)

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

This project has been awarded funding by the **Longfonds**, which validates that the proposed studies are innovative, interesting, and well-designed (as described by the (inter)national reviewers of the grant).

The consortium consists of three expertise centres, Utrecht University (**UU**, [redacted] the University of Groningen (**RUG**, [redacted] and the University Medical Centre Groningen (**UMCG**, [redacted]) that each provide specific and complimentary expertise (**UU**: optimized animal models of COPD exacerbations [redacted] **RUG**: alveolar progenitor cell biology and pharmacology, **UMCG**: clinical and translational research related to COPD exacerbations).

RUG and **UMCG** unite in the Groningen Research Institute of Asthma and COPD (**GRIAC**), which is home to several unique clinical COPD cohorts. The multidisciplinary and translational research of GRIAC is the result of extensive collaborations between the research members from different disciplines.

RUG, **UU** and **UMCG** each offer access to key infrastructures required for the proposed work, including microscopy centres, animal facilities, and basic laboratories, as described in the different WPs (Figure 5). RNAseq support is available through the core facility at **UMCG**.

We believe this unique consortium is of exceptional scientific caliber considering the complimentary and distinct expertise that each of the partners provides in order to **collaboratively** answer the posed research questions. The already up-and-running research programs at each of these sites facilitate an effective start of the project and meaningful integration of the individual research lines. Especially, the running grant proposal from the **RUG** awarded by Health Holland (TKI-LSHM22013), which focuses on characterizing the imprinting effect of the pro-inflammatory environment on *in vitro* epithelial progenitors, will provide ample *in vitro* information on epithelial progenitors, which can serve as a template for measurements *in vivo*.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

- No
- Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

Identifying novel therapeutics aimed at preventing/reversing rather than managing chronic lung diseases is the long-term scientific goal of this consortium. The results of the proposed studies will provide fundamental new insights into the mechanisms underpinning defective tissue repair in COPD, whilst yielding patentable knowledge on pathways and targets that can be utilized for the development of therapies for COPD and other diseases. Recall that COPD causes 6% of all deaths (www.who.int) and the health and economic burden of the disease is still increasing, currently affecting over 200 million people worldwide. The WHO indicates that COPD is the third leading cause of death in westernized countries. In related chronic lung diseases, including asthma, idiopathic pulmonary fibrosis, and lung cancer, there is a similar need for therapeutic strategies that direct airway and lung repair. Likewise, most chronic diseases that have a component of fibrosis would benefit from interventional tissue repair strategies. Thus, therapeutically addressing tissue repair is of major scientific, clinical, and societal interest.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

Stakeholders of the project:

1. Different universities and medical center

The consortium comprises three expertise organisations:

- Utrecht University (██████████)
UU: longstanding experience with optimized animal models of COPD (exacerbations) and testing pharmacological agents
- University of Groningen (██████████)
RUG: Extensive knowledge about alveolar progenitor cell biology and pharmacology
- University Medical Center Groningen (██████████)
UMCG: Expertise in clinical and translational research related to COPD exacerbations

The scientists at the universities will conduct innovative research that will lead to more knowledge about COPD treatments (understanding of the mechanisms of exacerbations). The medical center is really interested in investigating new techniques and treatments for their patients, which may directly lead to clinical trials with COPD patients. Their goal is to make a difference in society with novel therapies improving lung recovery and preventing progressive lung damage, which will ultimately lead to longer life expectations and diminished impact on the quality of life.

2. **Animals (mice)** will be used in these experiments to answer the project questions. These mice will suffer and will be sacrificed to answer the project questions. Therefore, they can be defined as "harmed parts".

3. COPD patients (and possibly patients with other lung diseases)

COPD patients will benefit from the outcome of the project à the goal is to find more effective treatments that reduce/prevent/reverse lung function decline and improve quality of life.

4. Longfonds

Longfonds has the ambition to allow the results of research to directly benefit people with a lung disease. They allow people with a long illness to participate in the discussion and assessment of research. Under the direction of the Longfonds, top scientists, doctors and lung patients are working together intensively on a medical breakthrough for COPD.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

Figure 3 shows the connection between the different phases and the involvement of the different partners and grants within this research project.

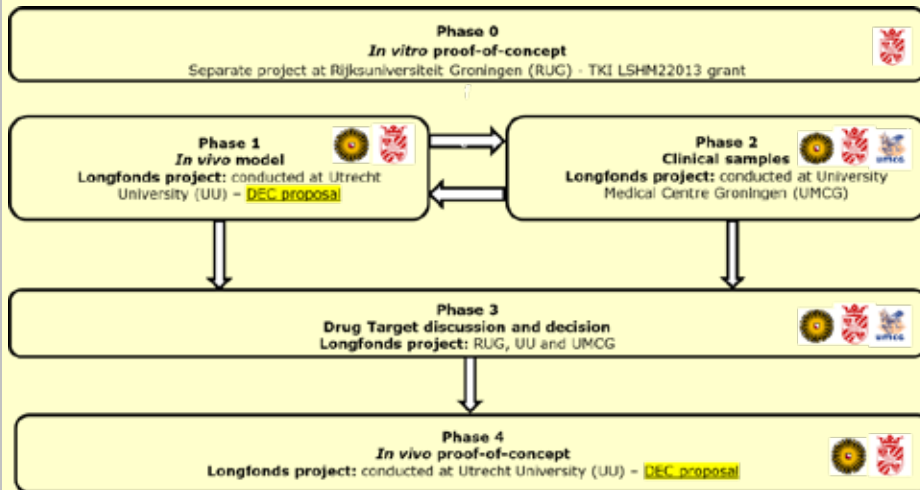


Figure 3. Involvement of different partners and grants within the research project.

Figure 4 depicts an overview of the overall design of the project with the different phases, the coherence within the project and the GO and GO-NO GO criteria.

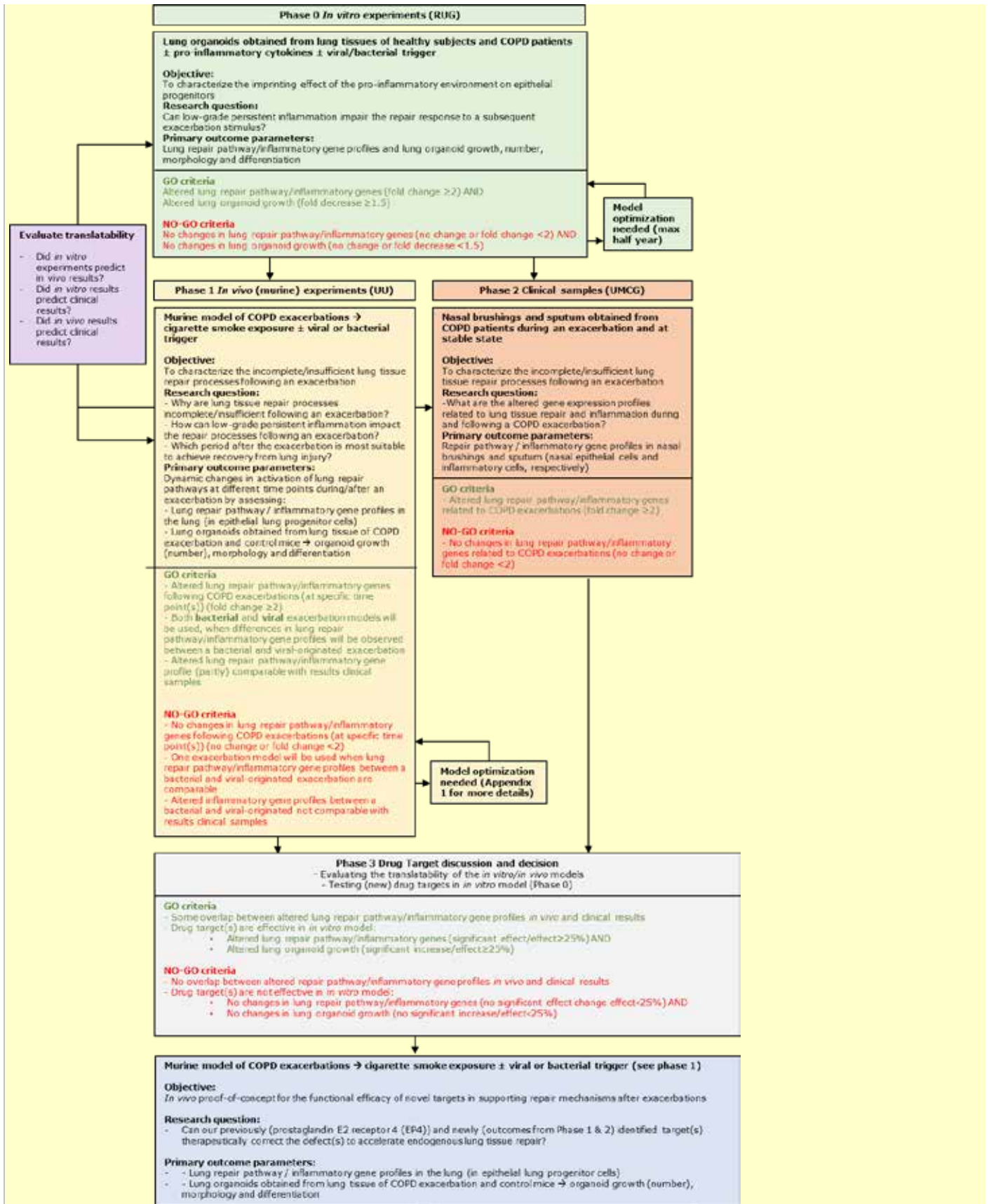


Figure 4. An overview of the overall design of the project with the different phases, the coherence within the project and the GO and GO-NO GO criteria.

Phase 0 (in vitro studies RUG)

Phase 0 has been started at the RUG (TKI LSHM22013), where a post doc is working on an *in vitro* model with lung organoids obtained from lung tissues of healthy subjects and COPD patients ± pro-inflammatory cytokines ± viral/bacterial and tries to answer the question whether (low-grade) persistent inflammation can impair the repair response to a subsequent exacerbation stimulus? We have close contact with this group at RUG and have regular meetings to discuss the data, progress, future plans and our *in vivo* experiments. This *in vitro* model is (almost) up and running and we do not foresee any problems with optimization of this model.

Phase 1 (murine studies UU)

In Phase 1 of this project a post doc and a PhD student (UU) will work on the *in vivo* experiments that characterize in detail how lung epithelial progenitors respond to the presence of bacterial and viral infections during COPD. In the healthy lung, such infections will normally trigger activation of epithelial progenitors to promote recovery from (severe) lung injury, while in COPD this recovery phase is incomplete (7-9). More details about Phase 1 (detailed GO-NO GO decisions) are depicted and described in the Appendix (B. The animals).

Murine model (validity)

COPD is usually caused by cigarette smoking and bacterial and viral respiratory infections are the main triggers of COPD exacerbations. To mimic an exacerbation, mice will be exposed to cigarette smoke in combination with a second hit of a **simulated bacterial or viral exposure**:

1. "Bacterial exposure": lipopolysaccharide (LPS), a major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria that mimics infection by Gram-negative bacteria and stimulates TLR4, **OR**
2. "Viral exposure": polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C), a synthetic analog of double-stranded RNA, a molecular pattern associated with viral infections that stimulates TLR3.

We will use a recently developed murine model of COPD exacerbations (Utrecht University in collaboration with Maastricht University, Longfonds-TKI grant (10.2.16.119)).

Our preliminary (unpublished) findings show that such combined exposures lead to exaggerated inflammatory cell influx (Figure 4).

Due to the complex COPD pathophysiology and physiological changes between human and mice (18,22), it must be noted that there is no optimal (murine) model of COPD (exacerbations) that replicates all of the characteristic features of human COPD, including chronic bronchitis-related and emphysematous changes, like lung inflammation, chronic bronchitis, mucus hypersecretion, small airway remodelling, emphysema, impaired lung function and systemic co-morbidities. The absence of respiratory bronchioles in mice may explain in part why bronchitis has proven to be difficult to model in mice (28). Therefore, we will focus on (and already successfully measured) emphysematous changes (alveolar enlargement), lung inflammation (inflammatory cells and mediators in lung tissue and BALF) and systemic comorbidities (systemic inflammation and altered responses in gut and brain) in our murine model of COPD exacerbations. These are symptoms/characteristics that are also observed in COPD patients.

It has been previously observed in studies using murine models that stem/progenitor cell populations located throughout the lung are capable of responding to injury and repairing damaged tissue (18,19).

Importantly, within our project, we will investigate whether the incomplete/insufficient lung tissue repair processes following an *in vivo* exacerbation (objective of the project) are comparable to the clinical situation.

We will evaluate the translatability of our different models:

- Will *in vivo* results predict clinical results?
- Will *in vitro* experiments predict *in vivo* results?
- Will *in vitro* results predict clinical results?

This information is important for future investigations. In this way, we will examine whether results of the different phases (*in vitro*, *in vivo* and clinical part) are comparable and can reduce the *in vivo* experiments in the future.

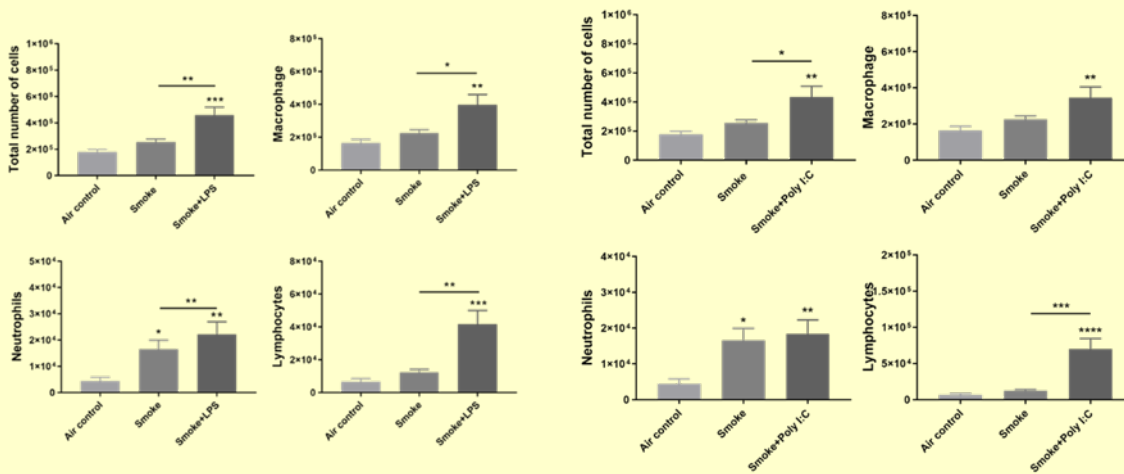


Figure 4. Inflammatory cell numbers in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Mice were exposed to air or cigarette smoke for 73 days, except on days 43, 53, and 63. On these days mice were treated with saline, lipopolysaccharide (LPS) (50 μ l of 2 μ g/mL) or polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) (50 μ l of 0.5 mg/mL) via intratracheal (it) instillation. Total number of BALF cells was determined and cells were differentiated into macrophages, neutrophils, and lymphocytes. Data are presented as means \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ vs air control (unless indicated otherwise).

Using this murine model of COPD exacerbations, we would like to evaluate the dynamic changes in activation of lung repair pathways by investigating, for example, genes related to repair pathways (e.g. WNT and Notch signaling, growth factors), inflammation (e.g. pro-inflammatory cytokines), and expression of epithelial markers in the lungs (which (sub)populations of epithelial stem/progenitor cells will be activated?) at different time points during/after an exacerbation. More information about the readouts to assess lung regeneration/repair and time points of sacrifice has been described in Appendix 1.

In phase 1 we would like to use the cigarette smoke exposure model with additional **bacterial** or **viral** trigger to characterize the incomplete/insufficient lung tissue repair processes following an exacerbation and investigate if there are differences in this repair process between viral and bacterial-originated exacerbations. If there are differences in this repair process (lung repair pathway/inflammatory genes) between viral and bacterial-originated exacerbations, we need both models for phase 4: *in vivo*-proof-of concept (and possibly also need to test different drugs within these models). If the lung repair pathway/inflammatory gene profiles between a bacterial and viral-originated exacerbation are comparable (comparable mechanism of action regarding lung tissue repair in both models), we can choose 1 COPD exacerbation model for the *in vivo* proof-of-concept (**Phase 4**). More details about the *in vivo* model of COPD exacerbations can be found in Figure 4 and Appendix 1. We have close contact with this group at UMCG and have regular meetings to discuss the data, progress, future plans and our *in vivo* experiments.

Phase 2 (clinical samples UMCG)

Next to the *in vivo* experiments at the UU, the post doc and PhD student (UU), will also perform clinical samples analyses in collaboration with the clinicians from the UMCG. We have recently performed a longitudinal study, in which sputum samples and nasal brushings were collected during a COPD exacerbation and at stable state (both before and after the exacerbation) from the same individuals. Whole transcriptome profiling will be performed on the inflammatory cells and nasal epithelial cells obtained from these patient sputum samples and brushings, respectively. With these results, we will have additional information about the altered gene expression profile related to lung repair during and following a COPD exacerbation and will compare the COPD exacerbation-associated human gene expression profile with the altered genes related to inflammation and activation of repair pathways observed in our *in vivo* study (Phase 1). In addition, we aim to determine if patients can be classified based on COPD exacerbations with a bacterial versus a viral origin, and whether changes in repair response, inflammatory gene expression, and signaling pathways during/after these exacerbations are different. If this is possible, we can compare the clinical observations with the obtained results from the *in vivo* COPD exacerbation model using LPS (bacterial trigger) and Poly I:C (viral trigger).

Phase 3 (Drug Target Discussion and Decision UU-RUG-UMCG)

In Phase 3 we will evaluate the translatability of the *in vivo* (+ *in vitro*) models and possibilities for drug target testing within our consortium (UU, RUG and UMCG). In addition, the time point (+duration) to start the drug therapy to support repair mechanisms after exacerbations will be discussed based on the obtained *in vivo* results.

We will compare the COPD exacerbation-associated human gene expression profile with the altered genes related to inflammation (e.g. pro-inflammatory cytokines) and activation of repair pathways (e.g. WNT and Notch signaling, growth factors) observed in our *in vivo* study.

- We will continue with **Phase 4** as we observe some overlap between altered repair pathway/inflammatory gene profiles *in vivo* and clinical results, but if there is no overlap between altered repair pathway/inflammatory gene profiles *in vivo* and clinical results, *in vivo* model optimization is needed before starting **Phase 4**.

- We will continue with **Phase 4** as drug target(s) are effective in the *in vitro* model (**Phase 0** model) and the drug target(s) are effective when we observe:

- Altered lung repair pathway/inflammatory genes (significant effect/effect \geq 25%) AND
- Altered lung organoid growth (significant increase/effect \geq 25%)

We will not continue with **Phase 4** as drug target(s) are not effective in the *in vitro* model and the drug target(s) are not effective when we observe:

- No changes in lung repair pathway/inflammatory genes (no significant effect change effect $<$ 25%) AND
- No changes in lung organoid growth (no significant increase/effect $<$ 25%)

Then we need to search for additional targets for lung repair stimulation.

We will select the most optimal drug targets (max. 5) for Phase 4 based on:

- Drug targets are related to altered repair pathway/inflammatory gene (and protein) profiles *in vivo* (fold change \geq 2)
- Drug targets (obtained with *in vivo* model) are (partly) comparable to the clinical results
- Drug target(s) are effective in the *in vitro* model

It is important to mention that as soon as the *in vivo* model is 100% optimized and *in vivo* data is (partly) comparable to the clinical results, we can immediately start testing the [REDACTED] receptor agonist *in vivo* (no *in vitro* testing needed as enough evidence has been collected that this substance is effective).

Phase 4 (murine studies UU)

Generally, two distinct strategies exist to achieve regenerative pharmacology in this project:

1. **Newly identified target(s)**: with the knowledge from **Phase 0, Phase 1, Phase 2 and Phase 3** in hand, we will be able to recognize key biological mechanisms that are defective during injury/repair cycles and identify promising new drug target(s).
2. **Our previously identified target à [REDACTED]** based on a transcriptomics-guided drug target discovery strategy using gene signatures from patients with smoking-associated COPD and mice chronically exposed to cigarette smoke, we have previously identified PGE2 as a potential drug target in alveolar epithelial progenitors (supporting repair). [REDACTED] Therefore, further exploring [REDACTED] receptors as a target to specifically address defective lung repair in respiratory diseases is promising.

We (the post doc and PhD student (UU)) will evaluate **newly as well as our previously [REDACTED] identified targets** using the same *in vivo* model of COPD exacerbations as summarized in **Phase 1**. [REDACTED]

These investigational compounds will be administered between the first LPS or Poly I:C trigger (exacerbation) till the end of the experiment (more details in Appendix 1). The exact treatment regime will be determined based on the results obtained from **Phase 1**. Read-outs will be similar to those described in Phase 1.

Selection points and decision criteria during this project for continuing or stopping the experiments (GO and NO-GO decisions) are summarized in Figure 4.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

This project consists of different phases:

- **Phase 0**: Complimentary *in vitro* experiments at RUG to characterize the imprinting effect of the pro-inflammatory environment on epithelial progenitors
- **Phase 1**: Murine model of COPD exacerbations at UU to characterize the incomplete/insufficient lung tissue repair processes following an exacerbation and identify how a background of cigarette smoke-induced inflammation impacts these repair processes.
- **Phase 2**: Clinical samples at UMCG to map the altered gene expression profile related to lung repair during and following a COPD exacerbation
- **Phase 3**: Drug Target discussion and decision (UU, RUG, UMCG) to evaluate the translatability of the *in vitro/in vivo* models and testing of (new) drug targets in the *in vitro* model (described in **Phase 0**).

- **Phase 4:** Murine model of COPD exacerbations at UU to therapeutically correct the defect(s) to accelerate endogenous lung tissue repair using our previously [REDACTED] newly identified targets (obtained from **Phase 0, 1 and 2**).

Phase 1 and **Phase 2** will be run in parallel as data from both are needed to render an optimal decision for Phase 3/4. In support of the comparison between clinical (human) and preclinical *in vivo* (mice) data within this project (Phase 1 and Phase 2), a complimentary *in vitro* project focused on "the characterization of the imprinting effect of the pro-inflammatory environment on *in vitro* epithelial progenitors" is running at the moment at the RUG (**Phase 0**). We will not start **Phase 4** until data from **Phase 0, Phase 1 and Phase 2** have been obtained (except for the [REDACTED] target, no *in vitro* testing is needed).

The unique translational approach of implementing *in vitro*, *in vivo*, and clinical experiments and evaluation of the translatability of these *in vitro/in vivo* models, along with the inclusion of a broad team of experts in their respective fields, make this project highly relevant and feasible. The outcomes of these studies may lead to the replacement, reduction, and refinement of animal experimentation in future COPD research.

3.4.3 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	3.4.3.1 Murine COPD exacerbation model
2	
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD10800202317292
2. Titel van het project : COPD exacerbations as a therapeutic window for lung repair?
3. Titel van de NTS : Het herstel van kapotte longblaasjes na een longaanval stimuleren

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 11-8-2023
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 16-8-2023 / 20-9-2023
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 23-8-2023 / 8-9-2023 en 27-9-2023 / 24-10-2023
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 3-11-2023

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 16-8-2023
- Plaats: Online in Teams
- Aantal aanwezige DEC-leden: 8
- Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers gehoord. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 23-8-2023 en 27-9-2023
- Datum antwoord: 8-9-2023 en 24-10-2023
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

Vragen:

De DEC heeft uw NTS en projectaanvraag op 16 augustus 2023 beoordeeld en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen.

Algemeen

- Wilt u, voordat u wijzigingen gaat aanbrengen in uw teksten, uw documenten eerst ontdoen van de gele arceringen, die nu al gebruikt waren? Deze teksten zijn namelijk niet gewijzigd op verzoek van de DEC.

- De gele arceringen zijn weggehaald in de nieuwste versie van de documenten.

Projectvoorstel

3.1 Achtergrond

- Bestudeert u hiermee ook andere oorzaken voor COPD of gaat het hier specifiek over COPD patiënten die blijven roken?

Antwoord: We bestuderen met dit model COPD veroorzaakt door roken, dat in ± 90% van de COPD-patiënten de oorzaak is van het ontstaan van deze ziekte.

- Richt de behandeling zich op preventie van exacerbaties of op het verlichten van te verwachten exacerbaties of beide?

Antwoord: De behandeling richt zich op het stimuleren van longweefselherstel tijdens/na een exacerbatie.

- De DEC heeft moeite met de term 'disease prevention' of begrijpt de bedoeling van 'prevention' niet. Wilt u dit a.u.b. toelichten/ vervangen door een andere tekst?

Antwoord: U heeft gelijk dat 'disease prevention' misschien niet de meest duidelijke term is, we bedoelden hiermee: het voorkómen van longweefsel schade. We hebben dit veranderd in de nieuwe versie van het document.

- Waarom kiest u voor het roken-model in de muis en niet voor een dier, waarin spontaan COPD voorkomt bv het paard (niet-infectieus) of het schaap (infectieus)?

Antwoord: Omdat in ± 90% van de COPD-patiënten roken de oorzaak is van het ontstaan van deze ziekte, hebben we gekozen voor een rookmodel in de muis. In het paard en schaap komt de etiologie van deze ziekte niet overeen met de mens. Alhoewel ook het rookmodel in de muis zijn tekortkomingen kent, is dit op dit moment het beste model, zoals uitgebreid staat beschreven in de 3.4 strategie onder 'murine model (validity).

3.3.2 Stakeholders

- Wilt u bij de stakeholders aanvullen, welk belang zij hebben? Dat hebt u nu alleen voor de patiënt gedaan.

Antwoord: We hebben bij de stakeholders aangevuld welk belang zij hebben.

- Wilt u toevoegen wie de stakeholder is, die de TKI funding bijdraagt? Wat is diens belang?

Antwoord: Dit project is gehonoreerd door het Longfonds, dit is toegevoegd aan het nieuwe document.

3.4 Strategie

- Hoe vaak herhaalt u een ronde/ gaat u terug naar een vorige stap? Wilt u dat duidelijker toelichten in figuur 3?

Antwoord:

- Fase 0: Bij de RUG is al een post doc begonnen met het in vitro organoid model heeft dit model zo goed als geoptimaliseerd, dus we verwachten hierbij dat we niet (vaak) terug hoeven naar een vorige stap/ronde moeten herhalen. Wel hebben we voor de zekerheid max een half jaar optimalisatie beschreven, om te voorkomen dat we te weinig tijd hebben voor de in vivo experimenten. We verwachten dat dit nog maximaal een half jaar duurt voordat we beslissen of we al dan niet de stap naar in vivo maken.

- Phase 1: De modeloptimalisatie in Fase 1 is in detail in Appendix 1 beschreven, dus hebben we in Figuur 3 globaler gehouden.

Aanpassingen zijn verwerkt in Figuur 3 en de tekst.

- Kunt u criteria geven voor go's en no-go's? Wanneer is iets relevant en wanneer is iets een cut off?

Antwoord: We hebben in de herziene versie duidelijkere criteria gegeven voor GO's en No-GO's.

- Op dit moment is fase 4 te vaag uitgewerkt voor de DEC om een goede afweging te kunnen maken. Kunt u al iets aangeven over welke stoffen u in fase 4 gaat testen en welke effect size zij minimaal moeten laten zien? Hoeveel dieren denkt u daarvoor nodig te hebben? Welke ingrepen met welk ongerief zullen hier plaats vinden?

Antwoord: We hebben Fase 4 gedetailleerder beschreven in de herziene versie van het proposal en we hebben een figuur gemaakt van de mogelijkheden in Fase 4 (Figuur 4).

- Stoffen: Ten eerste kunnen we 1 stof/behandeling die we gaan testen in Fase 4 in ieder geval aangeven, dit is namelijk de ██████ receptor-agonist. De clue van dit project is dat we aan de hand van alle data van Fase 0, 1, 2 en 3 aangrijpingspunten zullen vinden, waar we mee aan de slag gaan in Fase 4, helaas kunnen we daarom op dit moment de andere mogelijke kandidaten kunnen we nog niet beschrijven.

- De effect size is toegevoegd, het aantal dieren in Fase 4 is beter beschreven, net als de mate van ongerief.

- De details betreffende het aantal dieren voor Fase 4 en welke ingrepen en mate van ongerief zijn toegevoegd aan Appendix 1 + Figuur 4.

- In fase 3 gaat u evalueren. Kunt u aangeven welke criteria u gaat evalueren, voordat u doorgaat naar fase 4? Waarop zijn de behandelingen in fase 4 gebaseerd?

Antwoord: In Fase 3 gaan we de volgende punten evalueren (Zie ook het aangepaste Figuur 3!):

receptor-agonist in "Fase 0: in vitro experiments" te testen (genoeg bewijs verzameld om te beginnen met in vivo studies).

- Uit figuur 4 blijkt, dat u geen controles hebt gebruikt. Hoe kunt u conclusies trekken uit een experiment zonder controles?

Antwoord: We kunnen uit Figuur 4 concluderen dat het er een additionele verhoging te zien is in het totaal aantal cellen in de long na LPS of Poly I:C trigger in muizen blootgesteld aan sigarettenrook. Bij de Poly I:C trigger komt dit voornamelijk door de lymfocyten, en bij de LPS trigger zijn alle cel typen verhoogd (macrofagen, neutrofielen en lymfocyten).

Omdat we in de pilot studie nog niet de juiste controles (LPS en Poly I:C alleen) hebben meegenomen, hebben we in het huidige DEC proposal ruimte/tijd ingebouwd om dit model te optimaliseren indien nodig. Zie appendix 1 voor de GO-NO GO decisions gerelateerd aan in vivo model optimalisatie (o.a. in Figuur 6).

- In de tekst onder figuur 4 gebruikt u de term 'similarities'. Kunt u toelichten, wat u daarmee bedoelt?

Antwoord: Met "similarities" bedoelen we: Als de longherstelroute/inflammatoire genprofielen tussen een bacteriële en een virale exacerbatie **vergelijkbaar (similar)** zijn (vergelijkbaar werkingsmechanisme met betrekking tot longweefselherstel in beide modellen). Dit is nu verduidelijkt in de herziene versie van het proposal.

Bijlage 1

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

- Go en no-go cut offs lijken statistisch gebaseerd te worden op one-tailed power berekeningen. Is dat hier gerechtvaardigd? Wilt u toelichten, waarom u niet voor tweezijdig toetsen kiest?

Antwoord: *We hebben voor one-tailed power berekeningen gekozen omdat we onze focus hebben op een verbetering van longherstel, en niet op verslechtering hiervan. We zullen ook alleen de stoffen nemen, die in vitro verbetering laten zien, zodat de kans op verslechtering sterk verkleind (nihil) wordt. Tevens zullen we op werkprotocol niveau in goed overleg met een statisticus de meest optimale power berekeningen doen voor elk van onze experimenten.*

B. De dieren

- Wilt u in figuur 5 noteren in hoeveel dieren u iets gaat doen en op welk moment en hoe vaak u terug gaat/ herhaalt?

Antwoord: *In Figuur 5 hebben we duidelijker genoteerd met hoeveel dieren we iets gaan doen en op welk moment en hoe vaak we terug gaan / herhalen.*

- U baseert de keuze van de trigger op het vinden van 'similarities'. Wat bedoelt u daarmee?

Antwoord: *Met "similarities" bedoelen we: Als de longherstelroute/inflammatoire genprofielen tussen een bacteriële en een virale exacerbatie vergelijkbaar (similar) zijn (vergelijkbaar*

werkingsmechanisme met betrekking tot longweefselherstel in beide modellen). Dit is nu verduidelijkt in de herziene versie van het proposal.

- Hoe komt u aan de '2 dosages'? Moet daar geen dose-response finding in muizen aan vooraf gaan?

Antwoord: De 2 dosages die we beschrijven zullen worden gebaseerd op onze dose-response studie in muizen, die voorafgaand aan dit proposal heeft plaatsgevonden. De resultaten kunt u vinden in Figuur 5 in Bijlage 1.

- U schrijft in figuur 3 over 5 dagen rook en in de tekst over 7 dagen. Wilt u dat met elkaar in overeenstemming brengen?

Antwoord: Sorry voor deze fout, we hebben dit aangepast in de herziene versie van Bijlage 1.

- Wilt u toelichten, waarom u voor 7 dagen kiest?

Antwoord: We kiezen voor 7 dagen rook blootstelling, omdat de muizen verslaafd raken aan de sigarettenrook blootstelling. Dus voor het welzijn van de dieren zullen ze elke dag blootgesteld worden aan sigarettenrook en zullen we de muizen in het weekend niet onthouden van sigarettenrook, zodat ontwenningverschijnselen voorkomen kunnen worden. Dit stond beschreven in Appendix 1 bij "G. Replacement, reduction, refinement".

C. Huisvesting en verzorging

- Is huisvesting in de rookcabine volgens de bijlage van de Directive? Wilt u beschrijven, hoe de omgeving er voor de muizen uit ziet?

Antwoord: De muizen zullen maximaal 45 min per dag in de rookcabine plaatsnemen, dus echt "huisvesting" kunnen we dit niet noemen. Ook de controle groep die blootgesteld wordt aan "normale" lucht zal in dezelfde soort bakken gehuisvest worden voor 45 min. De dieren zitten in de rookcabine in verschillende bakjes, en we proberen zoveel mogelijk de dieren van dezelfde kooi in hetzelfde bakje te doen. Er is geen kooiverrijking aanwezig, zoals buizen, zaagsel, tissues, want dit stoort de flow van sigarettenrook blootstelling, wat zal leiden tot meer variatie van blootstelling per groep/dier.

D. Pijn en welzijnsaantasting

- Brengt u dieren onder sedatie bij een intratracheale toediening?

Antwoord: Ja, we brengen de dieren onder korte sedatie bij intratracheale toediening van de triggers. Dit is verbeterd in de herziene versie van Bijlage 1.

E. Humane eindpunten

- Wat kan de toegevoegde component bij de inductie van de exacerbatie bewerkstelligen in het fenotype? Hoe ziek worden de dieren?

Antwoord: Er wordt verwacht dat de toegevoegde component bij de inductie van de exacerbatie extra ontsteking kan bewerkstelligen. We hebben in voorgaande experimenten gezien, dat dit

zich niet klinisch uit en dat er niet meer dieren het humane eindpunt bereikten dan in een "normaal" COPD model (zonder triggers).

- Kunt u uitleggen, waarom u 5% HEP verwacht?

Antwoord: We hebben de HEP opnieuw berekend gebaseerd op vorige COPD (exacerbatie) studies (welfare evaluation forms), en hebben het nieuwe HEP % ($\pm 2\%$) toegevoegd aan de herziene versie van Bijlage 1.

- U kijkt naar 'puffy breathing', maar is dat voldoende gericht op COPD-achtige verschijnselen. Zou u specifiekere kunnen zijn?

Antwoord: Mensen met COPD-exacerbaties vertonen: Kortademigheid en benauwdheid. Bij muizen letten we daarom vooral op een moeilijke ademhaling (kortademigheid) in combinatie met een bol-zittende houding en cyanose wordt gemonitord. Dit hebben we duidelijker beschreven in de herziene versie van Bijlage 1.

- Kunt u definiëren, waar u aan herkent, dat de muis een onomkeerbaar moment heeft bereikt?

Antwoord: Een muis heeft een onomkeerbaar moment bereikt als:

- Als dieren binnen een periode van twee dagen meer dan 15% van hun gewicht verliezen.*
- Als muizen een pilo-erectie hebben gehad, samen met verminderde mobiliteit en ademhalingsproblemen, die na 1 uur niet zullen verbeteren.*
- Moeilijke ademhaling (kortademigheid) in combinatie met een bol-zittende houding, cyanose wordt gemonitord.*

Dit is nu duidelijker beschreven in Bijlage 1 van de herziene versie.

F. Classificatie van ongerief

- Wilt u in een tabel alle handelingen (ook huisvesting, sample afnamen, intratracheale toediening) opsommen plus hoe vaak of hoe lang de dieren de handelingen ondergaan en op basis daarvan een cumulatief ongerief noemen?

Antwoord: We hebben een tabel toegevoegd met alle handelingen plus hoe vaak of hoe lang de dieren de handelingen ondergaan en hebben op basis daarvan een cumulatief ongerief genoemd.

Vragen:

De DEC heeft uw NTS en projectaanvraag op 20 september 2023 beoordeeld en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen.

Projectvoorstel

3.1 Achtergrond

- Uw antwoord op de eerdere vraag verhelderde niet volledig. Richt uw vraag zich ook op patiënten, die door blijven roken nadat ze COPD hebben ontwikkeld?

Antwoord: Ten eerste is het erg moeilijk te achterhalen hoeveel mensen er stoppen met roken na de COPD diagnose en het daadwerkelijk blijven volhouden niet te roken door de ernstige nicotineverslaving. Bijvoorbeeld, uit een studie in de Engelse populatie blijkt dat van de patiënten met COPD 35% rookt (1). Uit Amerikaans onderzoek blijkt dat bijna de helft (46 procent) van de rokers na de diagnose COPD gewoon blijft doorroken en in een Chinese studie staat beschreven dat 50% van de patiënten stopt binnen 16 jaar na de diagnose COPD (3).

Zowel de COPD patiënten die door blijven roken als de COPD patiënten die stoppen met roken kunnen baat hebben bij dit onderzoek. Ook COPD patiënten die stoppen met roken houden een blijvende ontsteking en er treedt geen spontaan herstel op van het longweefsel (4, 5), dus ook bij deze patiënten is er nog steeds behoefte aan onderzoek naar regeneratieve behandelingen.

In ons huidige in vivo model hebben we geen periode ingebouwd waarbij de muizen een tijd stoppen met roken, maar zien we dat ontstekingen (en longemfyseem) in de long zichtbaar zijn en dat de ontstekingen in de long erger zijn in dieren blootgesteld aan een bacteriële trigger + sigarettenrook (exacerbatie) en dit is wat we willen nabootsen en wat waargenomen wordt bij COPD-patiënten met exacerbaties (in rokers en ex-rokers).

Dit punt is verhelderd in de "background" van het herziene project.

References

- (1) *Van Eerd EA, Van Rossem CR, Spijt MG, Wesseling G, Van Schayck OC, Kotz D. Do we need tailored smoking cessation interventions for smokers with COPD? A comparative study of smokers with and without COPD regarding factors associated with tobacco smoking. Respiration 2015;90:211-9.*
- (2) *Doorgaan met roken na de diagnose COPD | MedNet (link)*
- (3) *Ruiping Wang, Yonggen Jiang, Chunxia Yao, Meiyong Zhu, Qi Zhao, Limei Huang, Guimin Wang, Ying Guan, Engelgau Michael, Genming Zhao. Prevalence of tobacco related chronic diseases and its role in smoking cessation among smokers in a rural area of Shanghai, China: a cross sectional study. Wang et al. BMC Public Health (2019) 19:753.*
- (4) *E. Gamble, D. C. Grootendorst, K. Hattotuwa, T. O'Shaughnessy, F. S. F. Ram, Y. Qiu, J. Zhu, A. M. Vignola, C. Kroegel, F. Morell, I. D. Pavord, K. F. Rabe, P. K. Jeffery, N. C. Barnes. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. European Respiratory Journal 2007 30: 467-471.*
- (5) *Marina Miller, Jae Youn Cho, Alexa Pham, Paul J Friedman, Joe Ramsdell, David H Broide. Persistent airway inflammation and emphysema progression on CT scan in ex-smokers observed for 4 years. Chest. 2011 Jun;139(6):1380-1387.*

- U geeft 25% als grenswaarde aan voor uw go/no-go's. Kunt u toelichten waarom u 25% als grenswaarde gebruikt? Wilt u in uw antwoord ingaan op de klinische relevantie van deze grens?

Antwoord: De grenswaarde van 25% is gebaseerd op eerder onderzoek van onze groep/samenwerking (1), waarbij we een in vitro model met humane / muis organoids hebben gebruikt en zien dat dit een haalbaar effect is op: 1. veranderingen in longherstel/ontstekingsgenen en 2. veranderingen in longorganoïde groei, geïnduceerd door interessante medicijntargets.

Het is natuurlijk altijd moeilijk om de vertaling te maken van een in vitro effect naar een in vivo/klinisch effect. En we kunnen de 25% verbetering in longherstel/ontstekingsgenen en in longorganoïde groei niet 1 op 1 vertalen naar een 25% verbetering in longfunctie!

Voor zover wij weten zijn er nog (bijna) geen klinische studies waarbij men probeert het longweefselherstel te bevorderen door regeneratie-therapie. Dus op basis van literatuur is het moeilijk om een uitspraak te doen over hoeveel verbetering in longfunctie mogelijk zou plaatsvinden na $\geq 25\%$ verbetering in longherstel/ontstekingsgenen en in longorganoïde groei. Desalniettemin, is het naar ons inziens zeker klinisch relevant als we $\geq 25\%$ verbetering zien in longherstelgenen en longorganoïde groei met onze veelbelovende medicijntargets, en dus het herstel van het longweefsel kunnen bespoedigen, dat geassocieerd zal zijn met een verbeterde longfunctie. Zeker omdat de huidige farmacotherapie voor COPD uitsluitend de snelheid waarmee de longfunctie afneemt minimaal vertraagd.

Reference

(1) Wu X, Bos IST, Conlon TM, Ansari M, Verschut V, Verkleij LA, D'Ambrosi A, Matveyenko A, Schiller HB, Königshoff M, Schmidt M, Kistemaker LEM, Yildirim AÖ, Gosens R. (2022) A transcriptomics-guided drug target discovery strategy identifies novel receptor ligands for lung regeneration. Science Advances.

3.3 Belang

- Bij stakeholders noemt u 'sudden'. Wilt u dat verwijderen/ anders formuleren?

Antwoord: Ok, het woord "sudden" is niet per se nodig en is verwijderd in de herziene versie.

- Bij stakeholders benoemt u het Longfonds. Zover de DEC bekend zijn er bij TKI altijd commerciële partners betrokken. De DEC wil graag weten welke commerciële partij bij uw project betrokken is.

Antwoord: Ik denk dat hier een misverstand is ontstaan en wil dit graag even toelichten.

Experimenten in Fase 1-Fase 4 • zijn beschreven in het goedgekeurde Longfondsproject Fase 0 (in vitro werk) • wordt door de Rijksuniversiteit Groningen (RUG) uitgevoerd binnen de TKI LSHM22013 grant

Fase 0 heeft nauwe aansluiting met ons Longfondsproject (Fase 1-4), want:

- De TKI LSHM22013 grant (in vitro proof of principle) is de voorloper van ons

Longfondsproject

- 1 van onze consortiumpartners van het Longfondsproject is de hoofdaanvrager van dit TKI LSHM22013 project

- We brainstormen en discussiëren over de samenhang van de 2 verschillende projecten en hoe we elkaar kunnen ondersteunen

De dierexperimenten die in dit onderzoek zullen worden uitgevoerd, vallen dus allemaal binnen het **Longfondsproject** en hier is geen commerciële partij bij betrokken.

We hebben de tekst waarin geprobeerd was dit te verduidelijken geel gemaakt. Tevens hebben we een Figuur toegevoegd om dit extra te verduidelijken (Zie Figuur 3 in het projectvoorstel).

Bijlage 1

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

- U komt met een powercalculatie uit op 17 dieren, verdeeld over twee groepen (groep van 7 en groep van 9). Kunt u deze proeven niet stapsgewijs uitvoeren? Zijn allebei de groepen nodig in één proef? Anders geformuleerd: Bent u geïnteresseerd in gen-profielen als u geen functioneel effect ziet en andersom?

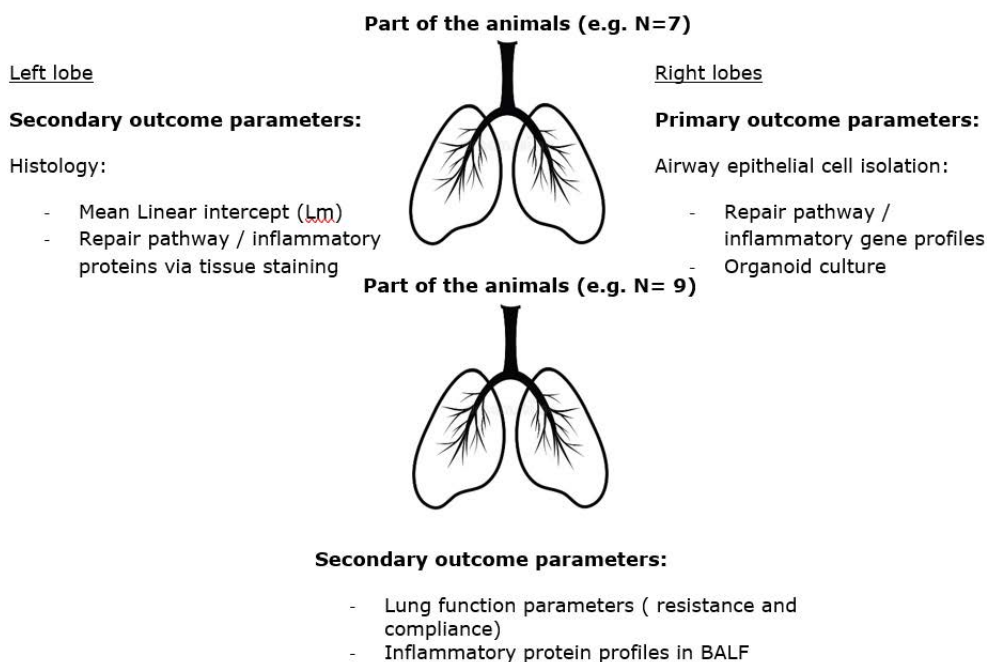
Antwoord: Goed punt! Om dieren te besparen zullen we de proeven stapsgewijs uitvoeren. (bijvoorbeeld: eerst de groep starten met de primary outcome parameters (bv. N=7) en als dit succesvol is, zullen we verdergaan met de groep met de secondary outcome parameters (bv. N=9)).

Bij berekening van het maximale aantal benodigde, leidt dit tot een iets hoger aantal. Dit omdat je nu ipv 1 experiment, 2 experimenten uitvoert en als je dan rekening houdt met 2% dropout, kom je iets hoger uit:

Dus ipv $16 + 2\%$ dropout = 17 dieren

$N=7 + 2\%$ dropout plus $N=9 + 2\%$ dropout = 18 dieren.

Maar de verwachting is dat dit overall dieren zal besparen, omdat er eerder ingegrepen kan worden als er op bepaalde parameters geen effect te zien is.



G. Vervanging, vermindering en verfijning

- Bij vermindering mist de mogelijkheid dat u in fase 4 mogelijk slechts één van beide triggers hoeft te gebruiken. Wilt u dat toevoegen?

Antwoord: Wij hebben in Bijlage 1 toegevoegd dat in Fase 4 de mogelijkheid bestaat dat slechts één van beide triggers/modellen gebruikt hoeft te worden.

Niet Technische Samenvatting

- De titel komt niet overeen met de titel van de projectvergunningaanvraag. Wilt u die met elkaar in overeenstemming brengen?

Antwoord: De titel beschreven in de NTS is in overeenstemming gebracht met de titel van de projectvergunningaanvraag.

- De huidige titel van de NTS focust op 'Het herstel van kapotte longblaasje' (emfyseem), maar de interventies lijken ook gericht op de ontstekingscomponent van de exacerbaties.

Antwoord: De interventies kunnen ook gericht zijn op de ontstekingscomponent van de exacerbaties, maar het einddoel van de interventie is hetzelfde, namelijk het herstel van kapotte longblaasjes stimuleren. Het kan bijvoorbeeld zo zijn, dat de ontstekingen het herstel van kapotte longblaasjes tegenhouden.

- Wetenschappelijke termen emfyseem, bronchitis, etc mogen best achter eenvoudig taalgebruik gezet worden.

Antwoord: we hebben de beschrijving van emfyseem en bronchitis niet gebruikt, maar COPD eenvoudig uitgelegd en ons gefocust op longaanvallen bij COPD, daarom hebben we in de herziene versie achter longaanval "(exacerbatie)" geplaatst.

Predicted harms

- Kunt u 'trigger' vervangen door het Nederlandse 'prikkel'?

Antwoord: Wij hebben "trigger" vervangen door "prikkel" in de NTS.

Expected harms

- Het gaat hier alleen over toename in ademhalingsfrequentie, wat alleen in muizen plaatsvindt, maar niet in mensen. Wilt u dit aanpassen?

Antwoord: Wij hebben deze zin aangepast in de herziene versie van de NTS.

- Kunt u 'waarnemingen' vervangen door 'waarneming'?

Antwoord: Wij hebben deze zin aangepast in de herziene versie van de NTS (door aanpassing, is het wel "waarnemingen" gebleven).

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. *De onderzoekers beschrijven de problematiek bij COPD patiënten, die te kampen krijgen met secundaire infecties in de luchtwegen. De werkhypothese is dat bij COPD patiënten de schade, die veroorzaakt is door deze luchtweginfectie, niet volledig wordt hersteld, waardoor de COPD langzaam steeds erger wordt. Het mechanisme van het herstel na een luchtweginfectie en de graduele verergering van de COPD zal worden bestudeerd. Met de gevonden resultaten kan men farmacologische interventies onderzoeken, die deze verergering moeten helpen voorkomen. De DEC heeft in het kader van de haalbaarheid o.a. vragen gesteld over de doelgroep, de te gebruiken modellen en uitleesparameters, de samenwerkingen met artsen en andere onderzoekers van een ander academisch centrum en wie het project financieel ondersteunt. Met de beantwoording van de vragen en het opnemen van beslismomenten voor vervolgonderzoek waarbij heldere criteria zijn aangegeven is de DEC van mening dat het project beoordeelbaar is en voldoende samenhang heeft. Collega onderzoekers zullen met organoïden afkomstig van patiënten materiaal en gezonde vrijwilligers onderzoeken of en welke chronische stimuli de chronische ontsteking initiëren. Met deze gegevens zal men in een muizen COPD model veroorzaakt door sigarettenrook de exacerbaties verder bestuderen. In parallel wordt in monsters van patiënten de genexpressie tijdens en na exacerbaties in kaart gebracht. En kan met deze gegevens specifieke therapie worden onderzocht (eerst in vitro en dan in vivo) of er een passende therapie ontwikkeld kan worden die het proces van herstel na een exacerbatie bevordert en voorkomt dat de COPD steeds erger wordt. Volgens de onderzoekers zal vermogen om longherstel te (re)activeren door farmacologische targeting een aanzienlijk potentieel hebben, omdat het op relatief grote schaal kan worden toegepast en kan worden gebruikt om de voortgang van de ziekte in een vroeg stadium te stoppen, wat resulteert in een echte ziektemodificerende behandeling. Bovendien kan een farmacologische benadering, die gericht is op specifieke signaleringsgebeurtenissen die verband houden met longherstel, regeneratieve strategieën waarbij stamcellen betrokken zijn, bevordert of ondersteunt. De aanvraag is wetenschappelijk getoetst door het Longfonds en wordt ook door hen gefinancierd. De DEC heeft nog wel vragen gesteld of de gegevens ook toegepast kunnen worden bij patiënten die bewust blijven door-roken, ook nadat COPD is vastgesteld. Maar volgens de onderzoekers hebben ook die patiënten baat bij het onderzoek. De DEC merkt nog op dat het aantal dieren in appendix 1, vraag B niet klopt, dit zou 2688 moeten zijn volgens de eigen berekeningen en de NTS.*

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën), te weten fundamenteel onderzoek en translationeel onderzoek, sluiten aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is *het bestuderen van processen bij COPD patiënten waar longweefsel na een infectie niet goed herstelt*. Het uiteindelijke doel van het project is *met de verkregen gegevens therapieën ontwikkelen (o.a. farmacologisch, stamcellen) die bijdragen aan een volledig herstel na een dergelijke infectie en verergering van COPD voorkomen*. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van *het onderzoeksveld, de artsen en de behandelaars* en de behoeften vanuit de patiënten en hun familie.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn weergegeven in onderstaande tabel:

Morele waarden	Welzijn	Autonomie	Rechtvaardigheid
Belanghebbenden			
<i>Onderzoekers</i>	<i>Interessant werk</i>	<i>Onderzoek doen</i>	<i>Kans op succes</i>
<i>Patiënten en familie</i>	<i>Gezondheid</i>	<i>Geen ziekte en verergering van de COPD.</i>	<i>Goed functioneren</i>
<i>Artsen</i>	<i>Patiënten kunnen helpen, voorkomen dat de ziekte erger wordt</i>	<i>Taak arts</i>	
<i>Samenleving</i>	<i>Goede economie Geen zieken</i>		
<i>Biotechnici</i>	<i>Interessant werk Welzijn, geen stress</i>	<i>Onderzoek (helpen) doen</i>	
<i>Longfonds</i>	<i>Stimuleren van onderzoek waar longpatiënten direct baat bij hebben</i>	<i>Financieel mogelijk maken dat onderzoek wordt uitgevoerd</i>	
<i>Proefdieren (muizen)</i>	<i>Geen pijn Geen stress Gezondheid Geluk</i>	<i>Natuurlijk gedrag Bewegingsvrijheid</i>	<i>Intrinsieke waarde Integriteit Geen instrument zijn</i>

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. *Het onderzoek wordt in bredere samenwerking tussen twee academische centra uitgevoerd en is door het longfonds gewaardeerd met een subsidie die dit onderzoek mogelijk maakt. De aanvragers hebben veel ervaring met COPD modellen. Er is een directie relatie met patiënten materiaal waarvan gegevens voor het in-vivo onderzoek zullen worden gebruikt.*
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. *Het onderzoek is helder uitgewerkt in diverse stadia met per deelvraag de experimentele opzet, de parameters en de gestelde doelen helder beschreven en waarop besloten kan worden of het onderzoek voldoende heeft opgeleverd voor de volgende fase van het onderzoek. De unieke translationele aanpak van in vitro-, in-vivo- onderzoek, de klinische experimenten en de evaluatie van de translatie van deze in vitro/in vivo modellen, gezamenlijk in een breed team van experts met elk hun eigen vakgebieden, maken dit project zeer relevant en haalbaar. De uitkomsten van deze onderzoeken kunnen volgens de onderzoekers mede leiden tot vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven in toekomstig COPD-onderzoek.*

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. *Alle experimenten zijn goed uitgeschreven met de specifieke handelingen, (methode, duur en frequentie) als mede gevolgen van de ziekte met per handeling het ingeschatte*

ongerief waarna het cumulatieve ongerief is ingeschat. De IvD heeft toegelicht dat deze inschatting overeenkomt met het vastgestelde ongerief achteraf van eerder uitgevoerde experimenten op dit gebied. De DEC heeft geen reden dit ongerief anders in te schatten.

12. De integriteit van de dieren wordt *fysiek aangetast door de vele veterinaire niet-noodzakelijke handelingen, die pijn en stress zullen veroorzaken. Daarnaast worden de COPD-dieren gedragsmatig aangetast doordat zij verslaafd raken aan rook/ door de rookverslaving. Deze aantastingen zijn echter noodzakelijk als men de experimenten goed wil kunnen uitvoeren.*
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Humane eindpunten worden verwacht in de COPD dieren, die door de ziekte adem te kort zullen komen. Deze criteria en het percentage zijn helder en navolgbaar beschreven volgens een toelichting van de IvD. De DEC heeft geen reden dit anders in te schatten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. *Een deel van het onderzoek zal wel in proefdier vrije modellen worden onderzocht (long organoïden van gezonde vrijwilligers en COPD patiënten). Maar de ziekte COPD is het resultaat van complexe processen in de long en het immuunsysteem, waardoor het moeilijk is om de ziekte met alleen longcellen na te bootsen. In dit project zullen de onderzoekers verschillende experimenten en technieken uitvoeren om kennis te genereren over de vraag, waarom longweefselherstel tijdens en na een longaanval bij COPD onvolledig is. Daarnaast zal het onderzoek naar nieuwe kandidaat-therapieën voor longweefselherstel na een longaanval in het hele dier in plaats van in de long organoïden ook een indicatie geven over de veiligheid van deze medicijnen voor toekomstige klinische studies (in de mens).*
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. *Er is per type experiment een goede power berekening gemaakt om de resultaten van de experimenten correct te kunnen interpreteren. Voor deze powercalculaties is informatie uit eerdere onderzoeken gebruikt en statistische programma's/ software om de minimaal benodigde groepsgrootte per individueel dierexperiment te berekenen.*
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. *De muizen worden dagelijks gecontroleerd op welzijn en alle handelingen (rook blootstelling, toediening van bacteriële/virale prikkels en medicijnblootstelling) worden zo kort en efficiënt mogelijk uitgevoerd door ervaren en bekwaam personeel. Verschillende technieken om luchtweg- en immuunparameters in muizen te meten zijn geoptimaliseerd binnen de eigen afdeling/ onderzoeksgroep. Muizen worden voor aanvang van het experiment waar mogelijk getraind voor het experimentele proces.*

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Er zullen in bijlage 1 alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden, omdat men de dieren in groepen gehuisvest wil hebben. De ervaring heeft geleerd dat mannetjes gaan vechten. Drop outs door vechten of langdurige solitaire huisvesting wordt hierdoor vermeden. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren en die hier ook een zekere verfijning is.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Na afloop willen de onderzoekers organen kunnen uitnemen voor verder ex-vivo onderzoek. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.

20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing, omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De DEC heeft nog enkele vragen gesteld en de NTS is hierop aangepast.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk directe doel *het bestuderen van processen bij COPD patiënten waar longweefsel na een infectie niet goed herstelt en het uiteindelijke doel met de verkregen gegevens therapieën ontwikkelen (o.a. farmacologisch, stamcellen) die bijdragen aan een volledig herstel na een dergelijke infectie en verergering van COPD voorkomen*, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de 2668 proefdieren plaats, met deels mild (961), deels matig (1654) en deels ernstig (53) ongerief. De aanvragers hebben in bijlage 1 vraag B een lager aantal opgegeven, maar de DEC meent dat dit een vergissing is en is uitgegaan in haar afweging van 2668 muizen. De DEC heeft ook meegewogen dat de onderzoekers vrouwelijke muizen willen gebruiken en niet beide geslachten. In deze fase van het onderzoek is aannemelijk dat deze gegevens translationeel kunnen zijn naar humane patiënten. Ook heeft de DEC uitvoerig gediscussieerd of de gevolgen van roken en het bewust dóór blijven roken het gebruik van proefdieren kan rechtvaardigen, omdat COPD patiënten die blijven door-roken immers ook een eigen verantwoordelijkheid moeten nemen. Zwaarwegend

was daarbij de uitleg van de onderzoekers dat COPD zich ook kan ontwikkelen bij niet-rokers en dat die er ook baat bij zullen hebben.

Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat *met de verkregen gegevens therapieën ontwikkeld kunnen worden (o.a. farmacologisch, stamcellen) die bijdragen aan een volledig herstel na een andere longaandoening en verergering van COPD voorkomen kan worden*. Het is aannemelijk dat de *fundamentele en translationele* doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het directe doel namelijk *het bestuderen van processen bij COPD patiënten waar longweefsel na een infectie niet goed herstelt en het uiteindelijke doel met de verkregen gegevens therapieën ontwikkelen (o.a. farmacologisch, stamcellen) die bijdragen aan een volledige herstel na een dergelijke infectie en verergering van COPD voorkomen kan worden, een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren*. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. 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 er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

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

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

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

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. De volgende knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.

Buiten de context:

De DEC heeft nog de volgende opmerking: het is verbijsterend dat zoveel nicotine verslaafden blijven door-roken na de gestelde diagnose COPD. Zou niet nog een extra toeslag op elk pakje sigaretten en vaping cartridges van 25% geheven moeten worden voor de financiering van bv afkick programma's voor verslaafden met eerste diagnose COPD en 25% voor preventie en vermijding? Hoewel het aantal rokers van sigaretten afneemt, neemt het aantal (meest jongeren) gebruikers van de vape nog steeds toe. De laatste groep stapt vaak over naar het roken van sigaretten.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD10800202317292

Bijlagen

2

Datum 11 augustus 2023

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 augustus 2023. Het gaat om uw project "COPD exacerbations as a therapeutic window for lung repair?". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD10800202317292. 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: 0800 789 0789.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

11 augustus 2023

Aanvraagnummer:

AVD10800202317292



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800

Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

Straat en huisnummer: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50

Postbus: 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie: Assistent Professor

Afdeling: Farmacologie

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie: Professor

Afdeling: Farmacologie

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag

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

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 november 2023
Geplande einddatum: 31 oktober 2028
Titel project: COPD exacerbations as a therapeutic window for lung repair?
Titel niet-technische samenvatting: Het herstel van kapotte longblaasjes na een longaanval stimuleren
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.540,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

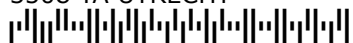


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-ASC

Postbus 80.011

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD10800202317292

Bijlagen

2

Datum 11 augustus 2023

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 11 augustus 2023

Vervaldatum: 10 september 2023

Factuurnummer: 2317292

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10800202317292	€ 1.540,00

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 te 's Gravenhage.

From: info@zbo-ccd.nl
To: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#)
Cc: [REDACTED] DEC-Utrecht@umcutrecht.nl
Subject: Aanhouden AVD10800202317292
Date: vrijdag 10 november 2023 10:57:50

CAUTION: This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

Geachte [REDACTED]

Op 11-08-2023 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "COPD exacerbations as a therapeutic window for lung repair?" met aanvraagnummer AVD10800202317292. 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

- In de NTS stelt u het volgende: 'Daarnaast zullen we wereldwijd de eersten zijn die experimenteel bewijs leveren, dat het richten op de longaanval met nieuwe kandidaat-geneesmiddelen, kunnen helpen om schade te voorkomen of te zorgen voor beter herstel van het longweefsel na een longaanval.' Deze stelling geeft aan dat u nu al zeker weet dat er positieve uitkomsten zijn in uw onderzoek met de kandidaatgeneesmiddelen. Kunt u deze stelling nuanceren?

- In de NTS maakt u gebruik van moeilijke woorden zoals in vitro en immuunparameters. Deze termen zijn voor het algemeen publiek niet navolgbaar. Kunt u de termen uitleggen of aanpassen?

- In de bijlage dierproeven geeft u aan het onderzoek te gaan uitvoeren in enkel vrouwelijke dieren. Kunt u deze informatie inclusief de onderbouwing waarom u enkel vrouwelijke dieren inzet ook in de NTS verwerken onder 'de keuze van de soort'?

- Kunt u de NTS in Excel format aanleveren?

Onduidelijkheden

- In de bijlage dierproeven geeft u in de tabel onder 'B' aan dat u 2420 dieren wilt inzetten in uw onderzoek. In de NTS en onder 'F' geeft u aan 2668 dieren te willen inzetten. Kunt u de aantallen consistent maken met elkaar?

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.

In principe heeft u 14 dagen de tijd om op deze vragen te reageren. Als u echter uiterlijk 16

november op deze vragen kunt reageren, kunnen uw antwoorden in de eerstvolgende CCD vergadering van 17 november worden ingebracht bij de bespreking van uw aanvraag.

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



www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0800 789 0789
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.



Telefoon 030 253 73 53
E-mail [REDACTED]
Datum 15 november 2023
Onderwerp Onduidelijkheden aanvraag:
AVD10800202317292

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Naar aanleiding van uw correspondentie d.d. 10 november 2023 t.b.v enkele onduidelijkheden in de aanvraag "COPD exacerbations as a therapeutic window for lung repair?" met aanvraagnummer AVD10800202317292, willen we graag de volgende aanvullende informatie geven:

Onduidelijkheden

Niet technische samenvatting

- In de NTS stelt u het volgende: 'Daarnaast zullen we wereldwijd de eersten zijn die experimenteel bewijs leveren, dat het richten op de longaanval met nieuwe kandidaat-geneesmiddelen, kunnen helpen om schade te voorkomen of te zorgen voor beter herstel van het longweefsel na een longaanval.' Deze stelling geeft aan dat u nu al zeker weet dat er positieve uitkomsten zijn in uw onderzoek met de kandidaatgeneesmiddelen. Kunt u deze stelling nuanceren?
- Deze stelling is [genuanceerd in de herziene versie van de NTS](#)
- In de NTS maakt u gebruik van moeilijke woorden zoals *in vitro* en immuunparameters. Deze termen zijn voor het algemeen publiek niet navolgbaar. Kunt u de termen uitleggen of aanpassen?
- De termen "*in vitro*" en "immuunparameters" zijn anders verwoord en/of uitgelegd.
- In de bijlage dierproeven geeft u aan het onderzoek te gaan uitvoeren in enkel vrouwelijke dieren. Kunt u deze informatie inclusief de onderbouwing waarom u enkel vrouwelijke dieren inzet ook in de NTS verwerken onder 'de keuze van de soort'?
- Deze informatie inclusief de onderbouwing zijn verwerkt in de NTS onder 'de keuze van de soort'.
- Kunt u de NTS in Excel format aanleveren?
- De NTS is in Excel format [aangeleverd](#).

Onduidelijkheden

- In de bijlage dierproeven geeft u in de tabel onder 'B' aan dat u 2420 dieren wilt inzetten in



uw onderzoek. In de NTS en onder 'F' geeft u aan 2668 dieren te willen inzetten. Kunt u de aantallen consistent maken met elkaar?

- Onze excuses voor deze fout, de aantallen zijn consistent gemaakt.

We hopen dat we op deze manier de onduidelijkheden hebben opgehelderd. Indien er nog vragen zijn horen we dit graag.

Met vriendelijke groet,

██████████



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 789 0789

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD10800202317292

Bijlagen

3

Datum 17 november 2023

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 11 augustus 2023 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "COPD exacerbations as a therapeutic window for lung repair?" met aanvraagnummer AVD10800202317292. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 20 november 2023 tot en met 31 oktober 2028.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2029 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Datum:

17 november 2023

Aanvraagnummer:

AVD10800202317292

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 3 november 2023. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 10 november 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de aantallen en de Niet-technische Samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2029 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

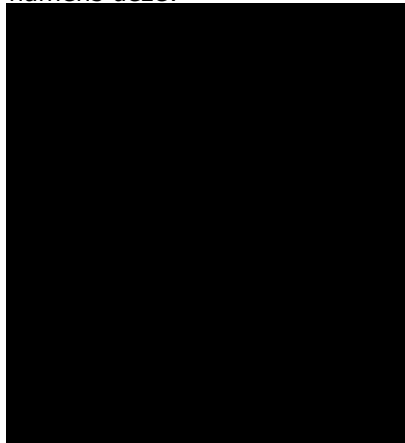
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

Datum:
17 november 2023
Aanvraagnummer:
AVD10800202317292

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: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 november 2023 tot en met 31 oktober 2028, voor het project "COPD exacerbations as a therapeutic window for lung repair?" met aanvraagnummer AVD10800202317292, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistent Professor. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 11 augustus 2023
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 3 november 2023;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Murine COPD exacerbation model, zoals ontvangen op 15 november 2023;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 15 november 2023;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 3 november 2023
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 15 november 2023.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Murine COPD exacerbation model			
	Muizen (Mus musculus) / Balb/c	2.668	2,0% Ernstig 62,0% Matig 36,0% Licht

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2029 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.

Aanvraagnummer: AVD10800202317292

- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:
AVD10800202317292

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd

Aanvraagnummer:
AVD10800202317292

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

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