

	Dossier: AVD11500202216225	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	2X
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	Gentherapie voor de behandeling van PLN-hartziekte
NTS-identificatiecode	NTS-NL-249044 v.1, 14-11-2023
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	hartziekte erfelijk therapie genezing
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Cardiovasculair, bloed- en lymfestelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Cardiovasculaire 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).	PLN is een erfelijke hartspierziekte die ontstaat door een verandering in het DNA (mutatie) in het PLN-gen. De ziekte is ontdekt in een grote Griekse familie en ook in Nederland komt de ziekte voor. Naar schatting zijn er zo'n 14.000 dragers van de PLN-mutatie in Nederland. Omdat de ziekte nog maar kortgeleden (2010) is ontdekt, weten we nog weinig over het ontstaan ervan en is er geen goede behandeling voor de ziekte. We weten dat de ziekte ongeveer evenveel voorkomt bij mannen als bij vrouwen en zich over het algemeen openbaart na het 50ste levensjaar. Niet alle dragers van de PLN-mutatie ontwikkelen de ziekte. Waarom de ziekte zich in de ene drager wel openbaart en in de andere niet, is op dit moment nog onduidelijk. Om meer inzicht te krijgen in de ontwikkeling van de ziekte zijn muizen- en varkensmodellen ontwikkeld waarin het PLN-gen aangepast is. Deze aanpassing is precies hetzelfde als de mutatie die we zien in mensen. Door gebruik te maken van deze genetisch gewijzigde dieren hopen we meer kennis te krijgen over het ontstaan en de ontwikkeling van de PLN-hartziekte. Daarnaast zullen we in dit project onderzoeken of we, met behulp van gentherapie, de ziekte kunnen behandelen of zelfs genezen. Gentherapie is een medische behandeling waarbij wordt ingegrepen op het DNA (ons erfelijk materiaal) van een patiënt. Met gentherapie is het mogelijk is om de PLN-mutatie weer te repareren. Het vinden van een therapie is niet alleen van belang voor PLN-hartziekte, maar ook voor andere erfelijke hartziekten waarvan de verandering in het DNA in kaart is gebracht.
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).	In deze aanvraag onderzoeken we de langdurige schade die ontstaat in het hart en bijdraagt aan de ontwikkeling van hartfalen in patiënten met de PLN-hartziekte. Op dit moment is er geen genezing mogelijk voor patiënten met PLN-hartziekten. Bij een groot deel van de patiënten ontstaat ernstig hartfalen en hebben de patiënten een steunhart of een harttransplantatie nodig. Dit onderzoek heeft als doel het ontstaan en het verloop van de ziekte beter te begrijpen en met behulp van gentherapie de ziekte te kunnen behandelen. Tegen het einde van dit project, hopen we, met behulp van de muizen- en varkensmodellen, beter in kaart te hebben welke prikkels het begin van de ziekte kunnen veroorzaken. Daarnaast zullen we beter weten hoe het beloop van de ziekte is. Verder hopen we een eerste versie van een gentherapie in handen te hebben die goede effecten heeft laten zien in het muismodel en ook in staat is het varkenshart te bereiken. Na beëindiging van dit project, wordt dit medicijn verder ontwikkeld om de werkzaamheid te kunnen in het PLN-varken om vervolgens de eerste stappen naar behandeling van patiënten te kunnen maken.

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>Om PLN-hartziekte beter te begrijpen en een nieuwe behandeling voor PLN-hartziekte te vinden zullen wij gebruik maken van muizen en varkens met een aangepast PLN-gen. Om het ontstaan van de ziekte te bespoedigen zullen we de harten van de muizen extra hard laten werken. Dit doen we door de dieren te laten rennen (vrijwillig of niet vrijwillig waarbij het dier wordt hierbij tot rennen aangezet door een elektrische schok) of door middel van een operatietechniek waarbij we de grote lichaamsslagader vernauwen (drukoverbelasting). Door deze vernauwing moet het hart harder samentrekken om het bloed rond te kunnen pompen. Een deel van de dieren zal een controleoperatie ondergaan waarbij alle operatiestappen gelijk zijn maar er geen drukoverbelasting ontstaat. De genterapieën die getest gaan worden, kunnen op verschillende wijzen toegediend worden, bijvoorbeeld via een injectie in de bloedstroom of direct in het hart. Toediening direct in het hart gebeurt door het openen van de borstkas waarbij het hart toegankelijk wordt. De operaties vinden plaats onder volledige narcose en de dieren ontvangen na de operatie pijnstillers. Op welke manier de behandeling gegeven zal worden, zal afhangen van het soort genterapie. De experimenten met de PLN-varkens bevinden zich nog in de pilotfase. Het eerste wat we daar gaan doen, is onderzoeken of deze dieren PLN-hartziekte ontwikkelen en we gaan bestuderen of genterapie in varkens even goed werkt als in muizen. Vervolgonderzoek in varkens zal onderdeel worden van een nieuwe aanvraag. Zoals eerder genoemd, zijn we geïnteresseerd in de ontwikkeling van de PLN-hartziekte. Om dit goed te kunnen onderzoeken is de duur van de experimenten maximaal twintig weken. Over een periode van vijf jaar verwachten we in totaal zes nieuwe genterapieën voor behandeling te zullen onderzoeken in muizen en de drie meest veelbelovende in varkens.</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>Een deel van de dieren zal een behandeling ondergaan waardoor de dieren hartfalen ontwikkelen. Net zoals bij mensen heeft dit invloed op het welzijn van het dier. Zo kunnen de dieren kortademig zijn en zich daardoor ziek voelen. Doordat het hart steeds een beetje slechter wordt en daardoor het hartfalen steeds erger krijgen dieren hiervan ernstig ongerief. Helaas is dit noodzakelijk om het ziektebeeld hartfalen goed te kunnen bestuderen. Er wordt dagelijks gekeken hoe het met de dieren gaat en we hebben duidelijke regels opgesteld voor wanneer een dier gedood wordt om onnodig lijden te voorkomen. Bij uitzondering zullen dieren alleen in een kooi geplaatst moeten worden. Dit kan bij muizen bijvoorbeeld als gevolg van vechtgedrag zijn. Omdat muizen groepsdieren zijn vinden ze het minder prettig om alleen in een kooi te zitten en dit zal invloed hebben op het welzijn van het dier.</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>2448</td> <td>0</td> <td>288</td> <td>1566</td> <td>594</td> </tr> <tr> <td>Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)</td> <td>156</td> <td>0</td> <td>48</td> <td>84</td> <td>24</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	2448	0	288	1566	594	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	156	0	48	84	24
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad																			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig																		
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	2448	0	288	1566	594																		
Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	156	0	48	84	24																		
<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>De dieren zullen aan het eind van het experiment gedood worden. Het is niet ethisch om dieren met hartfalen langer dan nodig te laten leven. Hiernaast hebben wij voor het volledig uitvoeren van het experiment de organen, en dan in het bijzonder het hart, van het dier nodig om goed het ziektebeeld te kunnen bestuderen</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.

Een groot deel van ons (voor)onderzoek wordt uitgevoerd met behulp van onderzoek in het kwekschaaltje met behulp van cellen. Voor dit project maken we gebruik van hartspiercellen waarin dezelfde aanpassingen in het PLN-gen aanwezig zijn. Alle gentherapieën die we in dit project willen testen, worden op voorhand getest door gebruik te maken van deze cellen. Alleen als we een positieve uitkomst zien in het kwekschaaltje, zullen we de therapie gaan testen in proefdieren. Het hart is een ingewikkeld orgaan dat bestaat uit verschillende cellen en structuren. We zijn momenteel nog niet in staat om in het kwekschaaltje een volledig hart na te maken. Ook als we nadenken over het gebruik van een afgewezen hart aangeboden voor transplantatie bij de mens, zal het, vooral vanwege de lage aantallen beschikbare donorharten vele jaren duren om onze onderzoeksvragen te beantwoorden. Bovendien is een los hart niet hetzelfde als een volledig lichaam waar alle onderdelen met elkaar in verbinding staan.

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.

Door gebruik te maken van een op voorhand vastgestelde onderzoeksstrategie met duidelijke beslismomenten, voorkomen we dat er onnodig proefdieren worden gebruikt. (1) Alle gentherapieën die we in dit project willen testen, worden op voorhand getest in gekweekte hartspiercellen. Alleen als we een positieve uitkomst zien in het kwekschaaltje, zullen we de therapie gaan testen in proefdieren. (2) In de eerstvolgende fase moeten we bewijzen dat de gentherapie ook werkt in het hart van gezonde muizen. (3) Vervolgens wordt deze gentherapie gebruikt om aan te tonen dat de behandeling de ontwikkeling van PLN-hartziekte kan voorkomen en/of afremmen. (4) In de laatste fase worden de meest veelbelovende therapieën voortkomend uit de muismodellen, getest in gezonde varkens om vast te stellen of de therapie het hart bereikt. Na afronding van deze laatste fase kan de gentherapie verder worden ontwikkeld en toegepast worden in het varkensmodel voor PLN-hartziekte. Voordat er besloten wordt door te gaan naar een volgende fase moeten de uitkomsten van de experimenten aan vooraf vastgestelde eisen voldoen. Op deze manier kunnen we snel herkennen of er toekomst zit in de beoogde therapie en voorkomen we onnodig gebruik van proefdieren. Voor elk experiment wordt met behulp van statistische methoden bepaald hoeveel dieren nodig zijn om een betrouwbare uitspraak over de uitkomsten van het experiment te kunnen doen.

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 gebruikte operatietechnieken worden regelmatig uitgevoerd door onze ervaren chirurgen, indien nodig wordt er bijgeschoold om vaardigheid te behouden. Dieren worden zoveel mogelijk in een groep gehuisvest, in kooien aangevuld met verrijking. Dieren worden onder steriele omstandigheden geopereerd en na de operatie worden ze gedurende 24 uur in een verwarmde omgeving gehouden om het herstel te bevorderen. Bovendien krijgen de dieren na de operatie pijnverlichting om de pijn te verminderen. Daarnaast worden ze intensief gecontroleerd op ongerief. Er zijn vooraf opgestelde regels over de maximaal toegestane ongeriefscore. Bij het bereiken van een bepaalde score worden dieren uit experiment gehaald en wordt het optreden van ernstig ongerief zo veel mogelijk voorkomen.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Muizen worden veel gebruikt in het cardiovasculaire onderzoeksveld en veel kennis over hartaandoeningen is verkregen uit muismodellen. Door de wijze waarop de muizen gefokt worden, lijken deze sterk op elkaar. Hierdoor komt de ontwikkeling van hartfalen in deze dieren ook sterk overeen en kunnen we heel goed onderzoeken welke processen een belangrijke rol spelen in hartfalen. Daarnaast zijn er op het laboratorium veel meer middelen beschikbaar die geschikt zijn om deze processen in muizen goed te kunnen bestuderen. Op het moment dat we een behandeling willen toepassen die al geschikt gemaakt is voor gebruik in mensen zullen we gebruik maken van

varkens. Varkens lijken in meerdere opzichten veel op mensen. Zo is het hart van een varken ongeveer even groot als dat van een mens en werkt het afweersysteem van een varken ook vrijwel hetzelfde als dat van mensen.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	15-10-2028
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	11500
		<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	
		Afdeling	Experimental Cardiology
		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 type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	Experimental Cardiology
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.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
1.7	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	030-2531569
		E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<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	16 - 10 - 2023
		Einddatum (t/m)	15 - 10 - 2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Gene therapy for PLN-R14del-induced cardiomyopathy.	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Gentherapie voor de behandeling van PLN-hartziekte	
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 2
	<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:
- 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	
Functie	
Plaats	Utrecht
Datum	
Handtekening	



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 (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'.	11500
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht
1.3 Provide the title of the project.	Gene therapy for PLN-R14del-induced cardiomyopathy

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

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

Op hetInvloket.nl leest u meer informatie over de verplichte bijlagen per categorie.

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.

PLN-R14del disease is an inherited cardiomyopathy caused by a mutation in the phospholamban gene (PLN), which consists of a nucleotide triplet (AGA) deletion, resulting in the loss of a highly conserved amino acid, Arginine, at position 14 of PLN protein (PLN-R14del). It was first discovered in a large Greek family with clinical manifestations of dilated cardiomyopathy and heart failure. Subsequently, in the Netherlands, a larger cohort of patients with dilated cardiomyopathy (15 %) and arrhythmogenic cardiomyopathy (12%) were identified as PLN-R14del carriers. More recently, the PLN-R14del mutation has also been identified in multiple families in other parts of Europe and North America.

All the known carriers and patients alike are heterozygous for the mutation. Patients carrying this mutation are often diagnosed with dilated cardiomyopathy and/or arrhythmogenic cardiomyopathy, with a phenotype including low-voltage ECG, high frequency of malignant ventricular arrhythmias, and end-stage heart failure (Haghighi, PNAS, 2006; van der Zwaag Neth Heart J, 2013). The severity of PLN-R14del-associated cardiomyopathy is evidenced by the fact that mutation carriers have higher incidences of malignant arrhythmias, premature sudden cardiac death and cardiac transplantation, as compared to dilated cardiomyopathy and arrhythmogenic cardiomyopathy patients without this pathogenic variant (van der Zwaag, European Journal of Heart Failure, 2012; van der Zwaag Neth Heart J, 2013).

With variable penetrance, PLN-R14del disease manifestation remains unpredictable. However, most patients come to clinical attention in the fourth decade of life (van Rijsingen, Circ Cardiovasc Genet. 2014). Extensive epidemiological studies also showed that many PLN-R14del carriers remain asymptomatic (Hof, Neth Heart J, 2019). Little is known regarding the triggers that could influence the clinical course of the disease in an individual carrier. Contributing factors may include external stressors, additional mutations, alterations of the PLN interactome, or combinations thereof.

PLN-induced cardiomyopathy patients are the largest patient population subjected to heart transplantation in the Netherlands (van der Zwaag Neth Heart J, 2013). Current treatment is based on symptom management and prevention of sudden cardiac death by implantable devices, drugs, and ultimately, heart transplantation. The current therapy is only marginally effective in modifying the time course of the disease and, importantly, there is currently no cure for this disease. Clearly, there is an urgent need to develop therapeutic strategies that may benefit patients carrying PLN-R14del mutation. **The main goal of this project is to test the therapeutic effects of targeted genetic manipulations *in vivo*, using PLN-R14del disease models.**

Gene therapy is a medical approach which seeks to modify or manipulate the expression of a gene or to alter the biological properties of living cells for therapeutic use. gene therapies can work by several mechanisms: 1) Replacing a disease-causing gene with a healthy copy of the gene; 2) Inactivating a disease-causing gene that is not functioning properly; 3) Introducing a new or modified gene into the body to help treat a disease; 4) Directly correcting the disease driving mutation or disrupt harmful genes in the genome of the patient (Gene Editing technology). There are a variety of options to deliver gene therapy products, including those relevant to this project: Viral vectors and Lipid nanoparticles (LNPs). Viruses have a natural ability to deliver genetic material into cells, and therefore some gene therapy products are

using viruses. Modified viruses can be used as vehicles to carry therapeutic genes into human cells. LNPs are synthetic, non-viral delivery systems that facilitate the entrapment (formulation) and delivery of therapeutic genetic material.

Viral vectors have the inherent capacity to enter cells and can effectively deliver their DNA or RNA cargo into the nucleus, with greater efficiency than non-viral vectors (Kariyawasam, Neurosurgery & Psychiatry 2020). Adenoviruses are the primary viral vector used for gene therapy (Crenshaw, Biomedicine 2019). Gene expression is fast and peaks within a few days after delivery, then diminishes gradually and ceases after approximately 4 weeks. However, the immune response to the adenovirus vector has been considered a potential safety concern in humans (Crenshaw, Biomedicine 2019). Adeno Associated Virus (AAVs) emerged as an alternative option owing to their low immunogenicity, their prolonged and high level of transgene expression and their ability to infect the myocardium (cardiotropism) shown by some of the serotypes such as AAV6, 8 and 9 (Bass-Stringer, Heart Lung Circ 2018; Kieserman, J Am Heart Assoc 2019). AAVs carry single-stranded DNA, and the gene construct stays as an episome that replicates autonomously from the host genome for >24 months after transduction, making AAVs highly suitable gene therapy (Bass-Stringer, Heart Lung Circ 2018; Kieserman, J Am Heart Assoc 2019).

Synthetic, non-viral delivery systems have been developed in recent years that facilitate the entrapment (formulation) and delivery of therapeutic genetic material/oligonucleotides (such as mRNA and siRNA) (Khalil, Expert Opin Drug Deliv 2019; Wang, Pharmaceuticals 2021). One of the most established systems are lipid nanoparticles (LNPs), of which the first intravenous formulation was approved for clinical application in 2018 (Khalil, Expert Opin Drug Deliv 2019; Wang, Pharmaceuticals 2021). LNPs can carry drug types that target cells at the DNA and protein level. This makes LNPs very interesting for genome editing delivery. A great example of successful application of LNPs is the COVID-19 vaccine from Moderna and BioNtech that had great success in the COVID pandemic (Schoenmaker. International Journal of Pharmaceuticals 2021). The potential application of LNP/mRNA nanomedicine in cardiovascular genome editing will be very interesting and be explored in this project.

We have previously tested gene therapy approaches targeting PLN-R14del mutation *in vitro*, using patient-specific PLN-R14del induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs). We observed that both correction of the PLN-R14del mutation by gene editing and overexpression of [REDACTED] vectors were sufficient to restore the healthy cardiac phenotype. However, to assess variables such as safety, efficacy, dosage and localization of transgene expression, animal models are necessary.

Next, we developed a humanized **knock-in** PLN-R14del mouse model, which recapitulates some of the early and acute aspects of the human disease, mostly being cardiac arrhythmia [REDACTED]. Signs of chronic PLN cardiomyopathy, including PLN aggregates, fibro-fatty replacement, have not been observed in the humanized R14del mouse model without providing an additional stressor to the heart. [REDACTED]

[REDACTED] These findings suggest the R14del mice require an additional cardiac stressor to develop chronic PLN cardiomyopathy. While we aim to further refine the model to be able to recapitulate chronic PLN-R14del-CM,

in parallel, we will use this model to validate the efficiency and efficacy of our gene therapy approaches for the repair and prevention of early PLN-R14del-CM *in vivo*. Once we are able to recapitulate chronic PLN-R14del-CM, we will validate the efficiency and efficacy of our gene therapy approaches for the treatment of chronic PLN-R14del-CM.

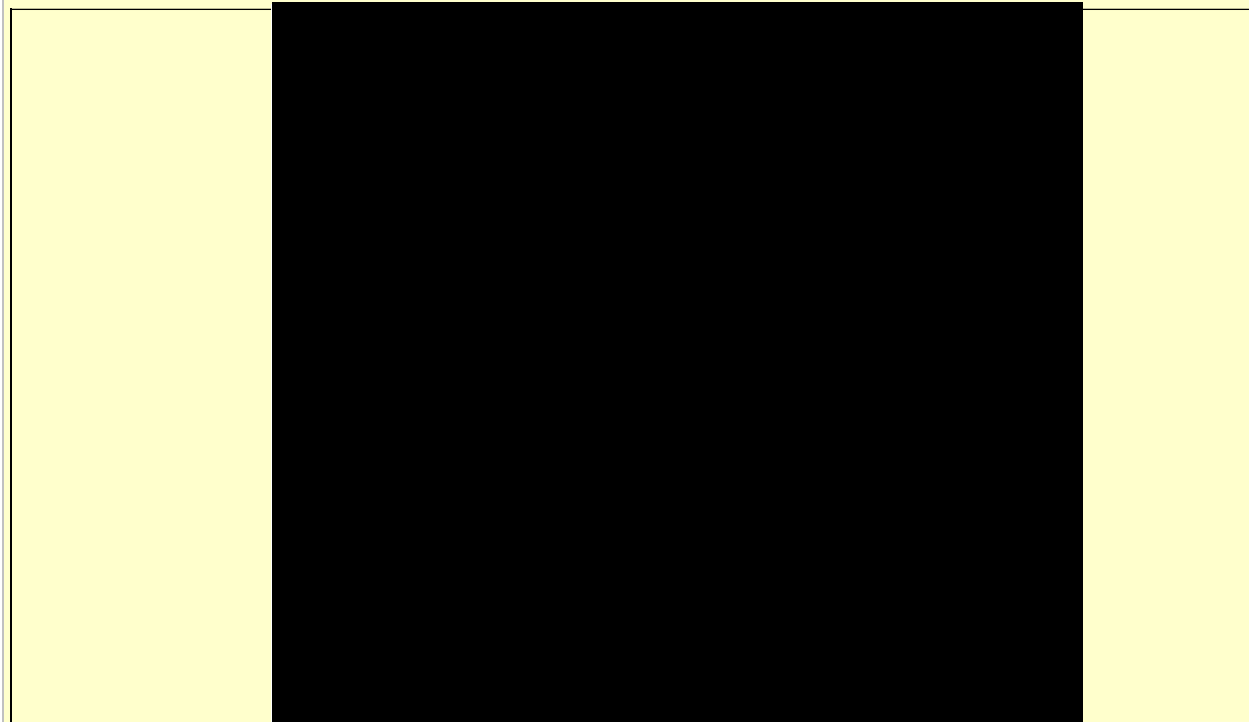


Figure 1. *Treadmill exercise exacerbates disease phenotype in PLN-R14del HET mice*

In order to translate our findings to the clinical situation larger animal models that more closely resemble human disease are required. The mice models we use are typically well suited to study molecular mechanisms that are involved in cardiomyopathy and heart failure and thus help us to better understand the disease progression. The physiology and immune system of the pig better resembles that of humans compared to mice and we therefore prefer the pig model to validate the efficacy of the selected gene therapies. Therefore, a [REDACTED] pig has been generated. As part of this project, we plan to assess the cardiac phenotype of these [REDACTED] pigs. In addition, effective delivery of the gene therapy strategies needs to be evaluated in the pig model, allowing further optimization of dosage, vector specificity, and delivery methods.

Gene therapy shows great potential as a targeted treatment for a variety of genetic cardiomyopathies caused by specific gene mutations, aiming to correct or compensate for the underlying genetic abnormalities. However, challenges like delivery methods, sustained gene expression, immune responses, and optimal timing and dosage need to be addressed. This application concerns fundamental research into the possibilities for gene therapy to repair and treat PLN-R14del cardiomyopathy. It covers design, testing and optimization of viral and non-viral formulations of gene-based therapeutics, including assessment and optimization of

delivery strategies, and finally evaluation of therapeutic potency of the approaches in the murine hPLN-R14del model. In addition, we will perform cardiac phenotyping in the [REDACTED] pigs and evaluate effective delivery and transgene expression of the preferred gene therapy approaches in pig hearts. If successful in the mouse model, our gene therapy approach will be assessed in larger animal models for hPLN-R14del, preferably the pig. In the future, the findings of this project could potentially be applicable to patients with PLN cardiomyopathies and could have implications for other cardiomyopathies caused by gene mutations.

Benefit beyond the scope of this proposal

The knowledge obtained from our research on gene therapy for PLN-R14del cardiomyopathy has the potential to benefit other PLN mutations and similar cardiomyopathies like dilated cardiomyopathy or arrhythmogenic cardiomyopathy. Additionally, understanding gene therapy approaches for PLN-R14del cardiomyopathy, [REDACTED] may contribute to the development of therapies for other gene mutations affecting calcium handling in the heart. Lastly, the investigation of delivery methods, immune responses, and dosage optimization in PLN-R14del cardiomyopathy may have wider applications in gene therapy for various cardiovascular disorders beyond cardiomyopathies.

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

The ultimate goal of this project is:

- To establish novel clinically applicable gene therapy approaches to prevent and treat inherited PLN-R14del cardiomyopathy leading to heart failure.

The six immediate goals of this project are:

1. To evaluate and optimize viral and non-viral gene delivery strategies for curing and preventing PLN-R14del cardiomyopathy.
2. To evaluate gene therapy for the treatment or cure of PLN-R14del [REDACTED] [REDACTED]
3. To refine the murine PLN-R14del model.
4. To evaluate and optimize viral and non-viral gene therapy for the treatment of established PLN-R14del-CM.
5. To assess the phenotype of the porcine [REDACTED]-[REDACTED] model.
6. To explore the possibilities for gene therapy in pigs

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

Our lab has shown to have the infrastructure and experience to perform research along the translational axis, from advanced *in vitro* models to small and large animal models and patient cohorts. The intradisciplinary team of principal investigators all have years of experience in the field and are part of the focus areas of regenerative medicine, circulatory health, and translational immunology of the UMC. Particularly the diverse expertise in our group, the close collaboration with the clinic, in combination with the translational approach makes our research unique in the field. Within our lab, we have broad experience with using cardiovascular animal models ranging from mice to porcine models

In addition, we have several tools available to generate cardioprotective therapies, including stem cell and iPSC derived cell therapy, extracellular vesicles and lipid-based nanoparticles, biologicals and small peptide inhibitors, gene editing, gene therapy using viral vectors, and tissue engineering. Moreover, in our labs, we have access to advanced *in vitro* model systems, advanced sequencing platforms, as well as a plethora of (molecular) laboratory techniques, including immunohistochemistry techniques, western blot, ELISA, that will aid to our mechanistic understanding of cardiac hypertrophy and heart failure

Both, long-standing expertise of involved researchers and access to appropriately equipped facilities, with respect to instrumentation and safety measures, will prevent negative effects on animals, humans and the environment, with specific focus on adherence to the principles of 3R.

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.

Click or tap here to enter text.

3.3 Relevance

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

It is estimated that 600 million people (1%) are living with genetic defects, 100 million have defects in the heart and 25 million patients have severe heart failure caused by genetic mutations at this moment in the world. Apart from the devastating effects it has on the lives of patients and their loved ones, it also puts tremendous pressure on our health care system. Prognosis for heart failure patients is extremely poor due to lack of curable therapeutic

approaches. Since no curative treatment is available for the majority of patients, it is crucial to establish gene therapy approaches to provide a definitive treatment for heart failure. The PLN patient population we are focusing on in this project is a relatively small population within this large population of heart failure patients. Nonetheless, positive findings we make within this project may have major implications not only for the PLN population, but for other genetic cardiomyopathy patients as well. With the research described in this proposal, we aim to not only improve our fundamental understanding of disease development in PLN-R14del cardiomyopathy but also develop new therapeutic targets that contribute to repair and treatment of heart failure development in this patient group.

Scientifically, this project proposed here is essential to bridge novel insights and developments in gene therapy and genome editing technology from basic research to clinical practice. The result of this project will also propel the usage of the underlying technology (e.g., viral and non-viral vectors for gene-based therapies, delivery strategies, avoiding potential side-effects and other safety aspects) for other applications including treatment of other genetic, and potentially even acquired, diseases in other organs.

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

Scientific community: interest in 1). further understanding of mechanisms of disease, 2). possibilities for gene therapy and repair of the gene defect in the heart

Medical specialists, including cardiologist, heart failure specialists and general practitioners: interest in the development of novel and specific therapies

Patients and patient organizations: interest in understanding their disease and the developments relating to treatment.

Society: interest in new therapies leading to increased life expectancy and better quality of life.

Pharmaceutical industry: interest in development of new therapies based on the research findings.

Animals: used as an experimental model, with subsequent involuntary discomfort. 3R principles will be applied as best as possible: by closely monitoring animal welfare, minimizing the number of animals used (see 3Rs: reduction and replacement) and, within project constraint, minimizing distress (see 3Rs: refinement).

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.

In order to eventually progress towards this project's ultimate goal, establishing novel clinically applicable therapies to prevent and treat PLN-R14del-CM, the project will be divided in six sub studies that partly run in parallel and partly sequential, being 1) optimization of gene therapy in mice, 2) repair and treatment of early, [REDACTED] remodeling in PLN-R14del mice, 3) model refinement to better mimic the human PLN patient, 4) repair and treatment of chronic, [REDACTED] remodeling in PLN-R14del mice, 5) characterization of the [REDACTED] - [REDACTED] pig model, and 6) exploration of possibilities for gene therapy in the pig heart.

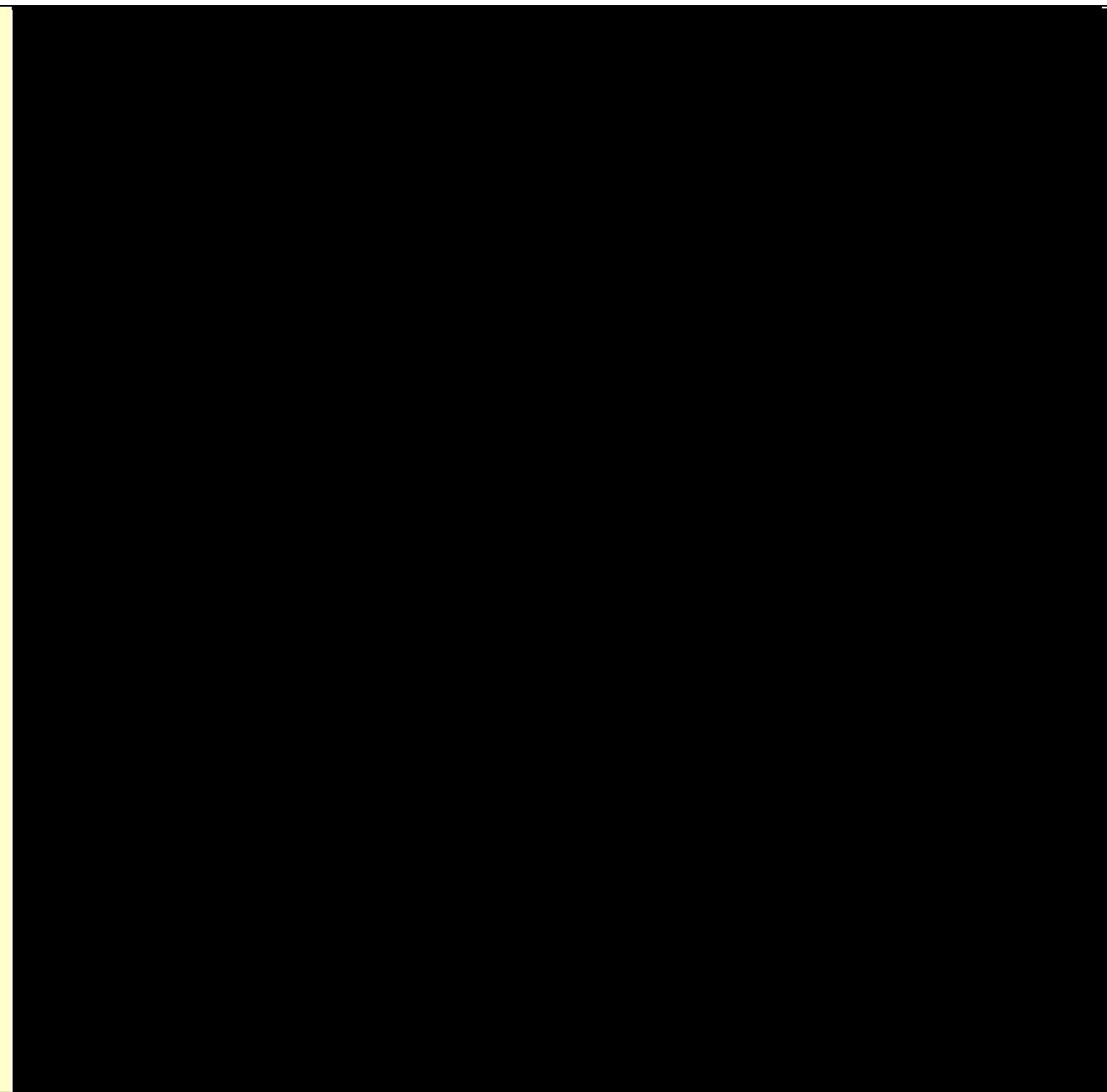


Figure 2: project strategy and go/no-go decisions

1. Substudy 1: All gene therapy approaches have been tested for effectiveness *in vitro*. Only those approaches that show sufficient, detectable expression in stem cell derived cardiomyocytes will be applied *in vivo* in healthy small animal models using various delivery routes (systemic, local cardiac). Only if detectable gene and protein expression of the transgene is observed in the heart we will consider the approach promising and will move to substudy 2. In case of undetectable gene or protein expression further optimization of the gene therapy is warranted. This is presented as **Go/No-go #1** in figure 2 and table 1.
2. Substudy 2: Animals will receive gene therapy. Electrophysiological remodeling will be induced and the presence of arrhythmias is monitored by ECG measurement. In case

the treatment does not prevent or significantly improve the primary outcome [REDACTED] the gene therapy will be further optimized or the treatment target is abandoned. In case of significant improvement of the primary outcome therapy can be tested in larger animal models (outside the scope of this project). **Go/No-go #2.**

3. Substudy 3: With this study we aim to further refine the model for chronic, [REDACTED] cardiac remodeling in order to better mimic the clinical presentation in human patients. Animals will be exposed to three different cardiac stressors. In case none of the cardiac stressor will induce statistically significant increase of the primary outcome [REDACTED] the study will be terminated. In collaboration with the animal welfare body alternative methods to induce cardiac stress will be inventoried and assessed for feasibility. These alternatives are not part of the license at this time. Addition of these alternatives will be requested through a change of the current modification or as part of a new CCD proposal. In case of significant increase in the primary outcome the study can progress to substudy 4. **Go/No-go #3.**
4. Substudy 4: In case the treatment does not prevent or significantly improve the primary outcome [REDACTED] the gene therapy will be further optimized, or the treatment target is abandoned. In case of significant improvement of the primary outcome the therapy can be tested in larger animal models (outside the scope of this project). **Go/No-go #4.**
5. Substudy 5: [REDACTED] pigs will be characterized for signs of electrophysiological and structural remodeling of the heart. In case the pigs do not show significant signs of cardiac remodeling the study will be terminated. In collaboration with the animal welfare body alternative methods to refine the model will be inventoried and if these methods are considered feasible, will be included in a new CCD proposal. **Go/No-go #5.**
6. Substudy 6: Based on the outcome of the *in vitro* studies and mouse studies described in appendix 1, the best performing gene therapy strategies will be tested in the pig model, using various delivery routes (systemic, local cardiac). Only if detectable gene and protein expression of the transgene is observed in the heart we consider the approach promising. In case of undetectable gene or protein expression further optimization of the gene therapy is warranted. **Go/No-go #5.**

Table 1: definitions of Go/No-go decisions per substudy

Substudy	Species	Primary outcome	Go	No-go	Statistical approach
1	Mouse	Transgene-positive cardiomyocytes in combination with upregulation of the target gene or genome correction frequency (relevant methods qPCR, Western Blot, Elisa)	detectable gene and protein	undetectable gene and protein expression	compare gene therapy vs control treated animals directly

2	Mouse	presence of [REDACTED]	≥ 40% reduction in [REDACTED]	< 40% [REDACTED]	compare PLN-WT and PLN-R14del treated vs control treated animals
3	Mouse	Presence of cardiac [REDACTED]	≥ 35% increase in [REDACTED]	< 35% increase in [REDACTED]	compare PLN-WT vs PLN-R14del with and without additional cardiac stressor
4	Mouse	Improvement of [REDACTED]	≥ 40% improvement of [REDACTED]	< 40% improvement of [REDACTED] function	compare treated vs control treated animals
5	Pig	Functional remodeling of the heart	presence of [REDACTED]	no detectable [REDACTED]	sequential analysis to allow proper powering of the study
6	Pig	Transgene-positive cardiomyocytes in combination with upregulation of the target gene or genome correction frequency (relevant methods qPCR, Western Blot, Elisa)	detectable gene and protein	undetectable gene and protein expression	compare gene therapy vs control treated animals directly

Use of animals:

The human PLN-WT and PLN-R14del mouse lines are currently already being bred in our animal facility house. Therefore, our heterozygous huPLN-R14del mice will be derived from breeding homozygous wildtype and mutant mice. Breeds are always used based on necessity

and promptly subjected to minimal breeding for maintenance after the experiments are finished. The incidence of PLN is similar in men and women; therefore we strive for equal use of male and female animals. However, in case a sex-specific phenotype development is identified, we can decide to use a single-sex only, or opt for the use of both sexes, which consequently will lead to expansion of the number of groups used for each experiment. For the porcine studies, we aim to be using both male and female pigs. However, due to difficulties with aggression and handling of male pigs we may decide to use female animals only.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The strategy outlined above, covers animal studies in two model species, chosen explicitly for applying different gene therapy approaches to repair and treat PLN-R14del cardiomyopathy. Gene therapy is of particular interest for non-curable diseases with a genetic defect as it can directly replace or repair this genetic defect. The current state of gene therapy approaches justifies their use in mechanistically and physiologically valid animal models to progress this field of research. The first market admission for AAV gene therapy in the Netherlands was provided to GLybera and Uniqure in 2012 for the treatment of Lipoproteïne-lipase-deficiency. The comprehensive evaluation of various delivery approaches, as discussed above, will greatly benefit our study and contribute to the progress of gene therapy research.

The similarity in the cardiac physiology and the immune system, as well as cardiac disease development between the human and porcine animal model make it possible to translate our findings into clinical practice (Barefield et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; Hulsurkar et al. *Circulation* 2021.; Wong et al. *Dis Model Mech* 2020.). Nonetheless, while our PLN-R14del animal models demonstrate certain aspects of the human disease, they do not fully encompass the complete human phenotype (). Thus, the primary objective of this proposal is to refine the mouse model of chronic structural remodeling, as described in Appendix 1, to more accurately replicate the comprehensive human phenotype associated with the PLN-R14del mutation. By refining the mouse model, we aim to bridge the existing gaps and achieve a closer representation of the complete human phenotype, facilitating further insights and applications in clinical settings.

We have previously shown that cardiac therapies often lose efficacy while moving up the translational axis (). It is therefore very important to validate the results from small animals in pre-clinical large animal models, such as pigs. Another reason is due to the similarity of the pig heart size with humans, which is important because many delivery methods widely used in clinics can't be applied in small animals such as catheter-mediated local delivery approaches.

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	Gene therapy approaches for the prevention and treatment of PLN-R14del cardiomyopathy in PLN-R14del mice

2	Characterization of [REDACTED] pigs phenotype and possibilities for gene therapy approaches in pigs
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.



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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	1	<i>Gene therapy approaches for the prevention and treatment of PLN-R14del cardiomyopathy in PLN-R14del mice</i>

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.

With this project we aim to establish novel clinically applicable gene therapy approaches to prevent and treat inherited PLN-R14del cardiomyopathy heart disease leading to heart failure by targeting and curing the underlying genetic cause for following up clinical trials.

In order to reach our goal we will be using the following experimental approach, which is visualised in figure 1.

1. Evaluation and optimization of viral and non-viral gene delivery strategies for curing and preventing PLN-R14del cardiomyopathy.
2. Evaluation of gene therapy for the treatment of PLN-R14del associated adverse electrophysiological remodelling.
3. Refining the murine PLN-R14del model.
4. Evaluate gene therapy for the treatment of PLN-R14del associated adverse structural cardiac remodelling.

Figure 1. Modelling of PLN cardiomyopathy in hPLNR14del mice. After evaluation and optimization of gene delivery strategies (substudy 1), the most promising therapies will be tested for the repair and treatment of PLN-associated adverse electrophysiological (substudy 2) and structural (substudy 4) remodelling. Before proceeding to substudy 4 we will refine the PLN-R14del model to better mimic the clinical presentation in patients. We will study if voluntary or forced exercise or increased cardiac afterload can provide a sufficient cardiac stressor to induce pathological structural remodelling of the heart resulting in the development of heart failure (substudy 3).

Substudy 1. Evaluation and optimising gene delivery strategies

To achieve the highest efficiency of transduction and expression, different vectors including [REDACTED] and different LNP formulations can be employed. With our gene therapy strategies, we aim to prevent PLN cardiomyopathy by repairing the genetic defect ([REDACTED]) and to treat the established disease [REDACTED]. In earlier pilot studies we have shown efficient transfection of cardiomyocytes both *in vitro* and *in vivo*, using the AAV vectors [REDACTED]. These vectors will be used as our starting point and we aim to further optimise them using different promoters and/or transgenes, alternative delivery routes and co-

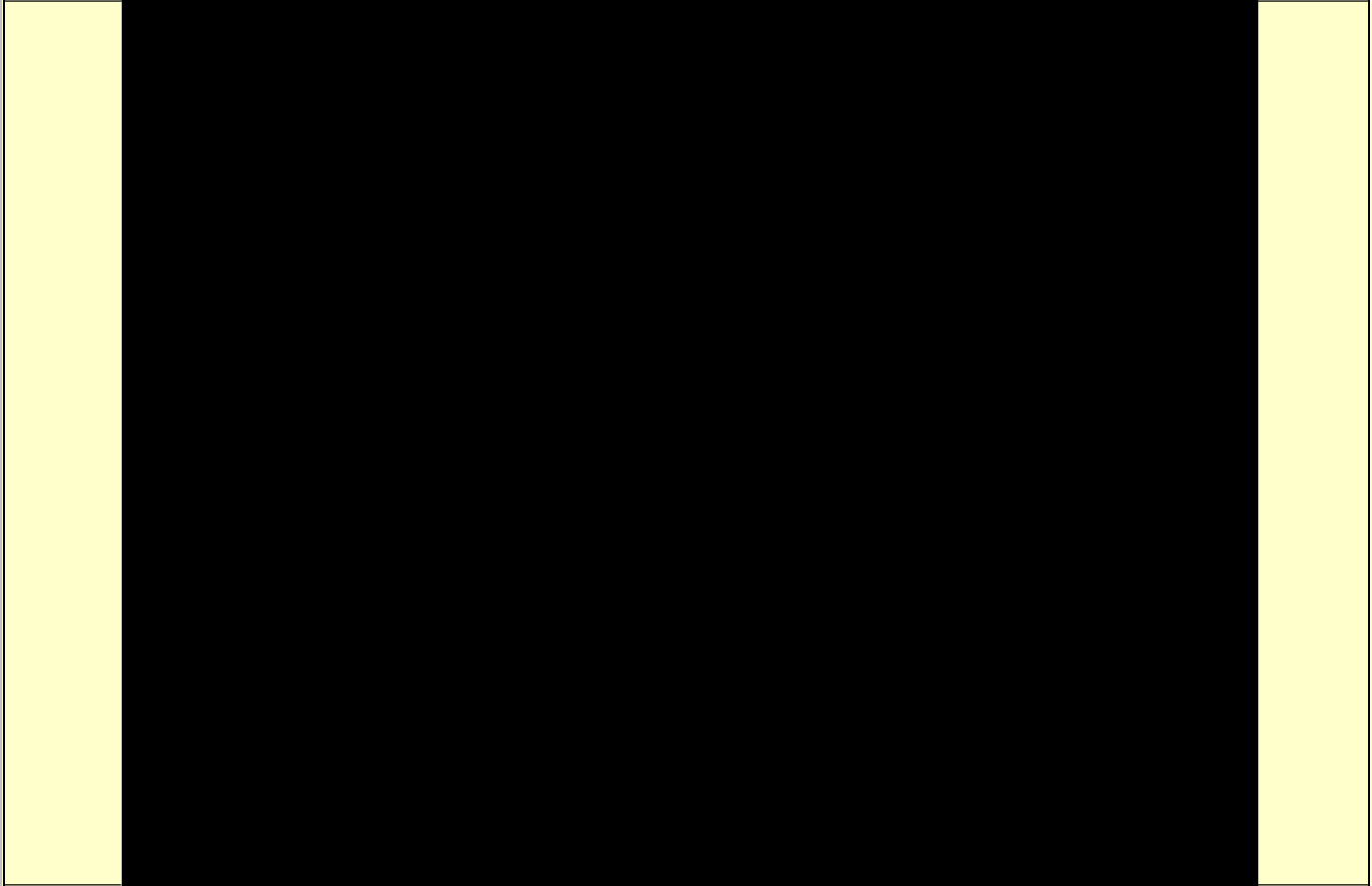


Figure 2. Treadmill exercise exacerbates disease phenotype in PLN-R14del HET mice. A) Running distance was measured five days a week, for a total of 6 weeks. B) Sirius Red/Fast Green staining of heart sections in WT and HET mice after 6 weeks of training. Cardiac fibrosis was quantified in each of the experimental groups and summarised in the bar graph.

In this project we aim to identify the best cardiac stressor that can induce substantial and reproducible cardiac remodelling evident both by functional impairment (echo/MRI) and structural changes (histology). In a stepwise research design, we will first test voluntary exercise (running wheel) as a cardiac stressor. In case we do not observe a sufficient degree of structural remodelling we will continue the experiment by employing forced exercise (treadmill). As a last cardiac stressor we can test cardiac pressure overload (Transverse Aortic Constriction) to induce structural remodelling. In case a cardiac stressor results in sufficient structural remodelling no further stressors will be tested. Go/no-go decisions are provided in figure 3 below and a detailed description of experimental procedures is provided in the section below.

Primary outcome parameter: Presence of structural remodelling (cardiac function measurements by 4D echocardiography, MRI and/or histology).

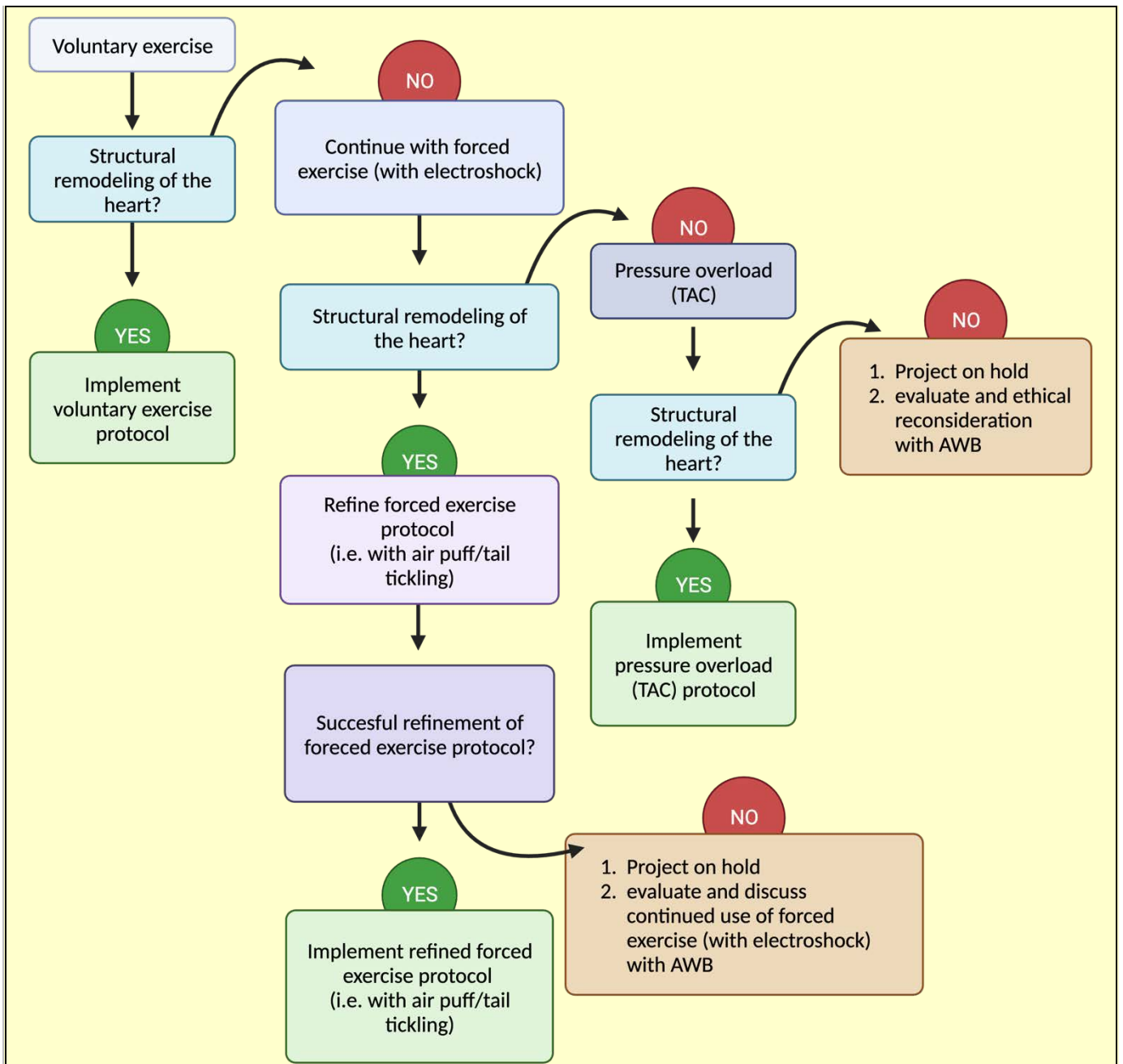


Figure 3. schematic overview presenting the go/no go decision for substudy 3

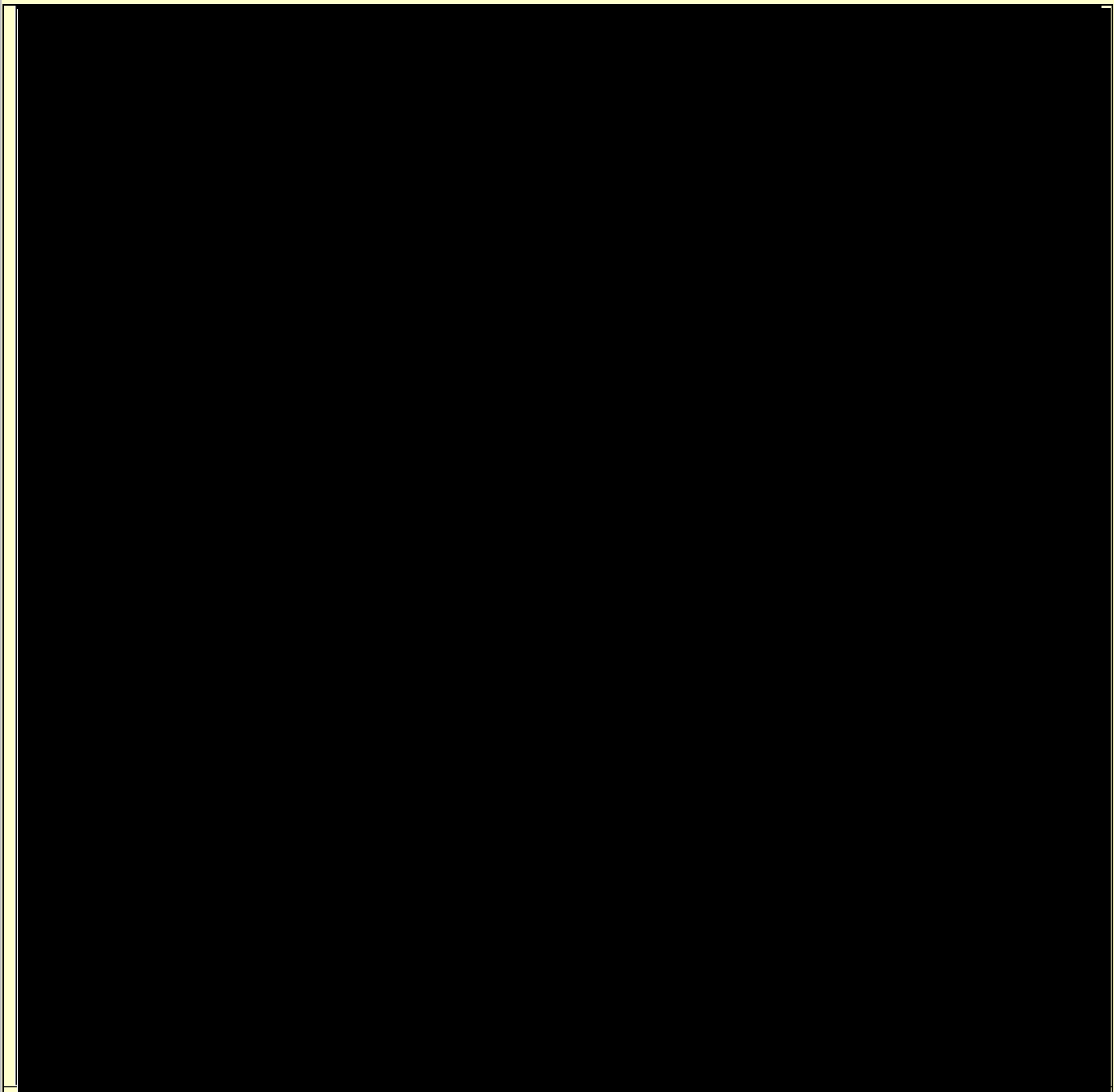
Substudy 4. Evaluation of gene therapy for the treatment of PLN-R14del associated adverse structural remodelling.

Available gene therapies and novel approaches selected from substudy 1 will be used to deliver therapeutic transgenes in the PLN-R14del mouse model. The aim is to prevent structural remodelling, evident by a decline in cardiac function. Structural cardiac remodelling will be induced in PLN-R14del (and hPLN-WT controls) mice by the best selected method from substudy 3 (e.g., voluntary or forced exercise, TAC), and gene therapy will typically be applied after structural remodelling has been initiated. Structural remodelling can be determined, amongst other techniques, by 4D echocardiography and MRI. A detailed description of experimental procedures is provided in the section below.

Primary outcome parameter: Presence of structural remodelling (cardiac function measurements by 4D echocardiography, MRI and/or histology).

Strategy and go/no decisions.

For each substudy clear go/no go decisions have been defined, which are presented in figure 4 below.



F
pigs are described in detail in appendix 2.

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

Experimental procedures

1. Baseline body weight and cardiac function measurement by ECG under anaesthesia (in agreement with the designated veterinarian).
2. Selected gene therapy will be applied. Route of administration, dosing and frequency will be based on the outcomes of substudy 1. In case of the use of viral vectors animals will be housed according to the designated biohazard restriction level. For AAV vectors, in most cases, no additional restriction is required.
3. Initiation of [REDACTED] remodelling. Animals will be anaesthetised (in agreement with the designated veterinarian) and positioned for ECG measurements. Following a period of 1-3 minutes of ECG monitoring, they will receive injections of stress-inducing substances such as [REDACTED]. ECG data will then be recorded for 10-15 minutes after the injection. Subsequently, the ECG measurements will be terminated and saved for later analysis to assess any electrophysiological alterations.
4. Cardiac function measurement (surface ECG). Mice will be anaesthetised (in agreement with the designated veterinarian) and placed on a warm (37 C) plate. To obtain surface ECG, 29 gauge needle electrodes will be positioned on the right arm and the left leg of the mouse. The ECG data will be recorded and analysed using PowerLab (AD instruments).
5. Terminal experiment under anaesthesia; collect blood and organs for lab analysis. Time of termination will be depending on the degree of electrophysiological remodelling.

Substudy 3. Refining the murine PLN-R14del model.

- 1) Baseline body weight and non-invasive cardiac function measurement by echocardiography/MRI under anaesthesia (in agreement with the designated veterinarian).
- 2) Initiation of cardiac stressor
 - a) Voluntary exercise (running wheel): cages will be equipped with 2 running wheels igloos per cage allowing animals to freely exercise and be housed in groups at the same time. Before starting the experiment, we will train the mice to ensure that mice are familiar with the running wheel.
 - b) Forced exercise (treadmill): strenuous treadmill exercise will be performed using an existing motor-driven treadmill (Harvard Apparatus) with adjustable belt speed (0-100 m/min), shock bars with adjustable amperage (0-2 mA), and an on/off shock switch for each lane. Before starting the experiment, mice will be allowed to freely explore the treadmill for 1-3 min or until each mouse has explored its lane and/or received at least one shock from the grid. Then, we will turn on the treadmill and slowly increase the speed until it begins moving (approximately 1.5 to 3.0 m/min). Mice will be monitored to make sure they start walking. If a mouse does not start walking or walks toward the shock grid, we will intervene by tapping the mouse with a wire brush or tickling its tail. Mice will be exercised at gradually increased speed at 7° incline, with speed initially set at 5 meters/min for 5 min, and then increased 1 meter/min every minute until time of exhaustion (when mice rest on the shock bar for more than 30 sec). Mice will then be removed and returned each to its cage. Mice will be subjected to a 5-day per week training protocol until significant changes in exercise endurance between groups are observed. As refinement for this forced exercise model we will perform pilot experiments using tail tickling or air puffs to stimulate running instead of shock as has been described (Bouganim & Bergdahl, Lab animal 2017).
 - c) TAC: minimally invasive TAC surgery under general anaesthesia (in agreement with the designated veterinarian). Induction of pressure overload by aortic constriction, close thorax (sham operation in a subgroup). After surgery, the mice receive appropriate pain relief (in

agreement with the designated veterinarian). Correct placement of the TAC is determined on day 7 by cardiac ultrasound.

- 3) Bodyweight and non-invasive cardiac function measurement (echocardiography/MRI). Animals will be sedated and immobilised on a warm (37°C) plate for echocardiography or MRI measurements. Cardiac function measurements are usually performed every 14 days starting from baseline to termination, but timing and frequency may deviate.
- 4) Terminal experiment under anaesthesia; collect blood and organs for lab analysis. Time of termination will be depending on the degree of adverse cardiac remodelling.

Substudy 4. Evaluation of gene therapy for the treatment of PLN-R14del associated adverse structural remodelling.

1. Baseline body weight and non-invasive cardiac function measurement by echocardiography/MRI under anaesthesia (in agreement with the designated veterinarian).
2. Initiation of cardiac remodelling. Method, duration and frequency will depend on the outcome of substudy
3. Non-invasive cardiac function measurement (echocardiography/MRI). Animals will be sedated and immobilised on a warm (37°C) plate for echocardiography or MRI measurements. Cardiac function measurements are usually performed every 14 days starting from baseline to termination, but timing and frequency may deviate.
4. Selected gene therapy will be applied. Route of administration, dosing and frequency will be based on the outcomes of substudy 1. In case of the use of viral vectors animals will be housed according to the designated biohazard restriction level. For AAV vectors, in most cases, no additional restriction is required.
5. Terminal experiment under anaesthesia; collect blood and organs for lab analysis. Time of termination will be depending on the degree of adverse cardiac remodelling.

General read-outs: During the experiments repeated body weight measurements, blood collection and functional measurements are performed to monitor disease progression (bodyweight reflects overall condition of the animal, blood collection to measure cardiac damage markers and functional measurements to monitor cardiac function). We expect the development of PLN-R14del cardiomyopathy and repetitive measurements to assess electrophysiological and structural changes, will result in moderate discomfort. Note: 35% of the animals will undergo cardioprotective treatment which is expected to decrease the severity of adverse cardiac remodelling. Consequential to decreased remodelling it is expected that these animals will develop less severe heart failure. The milder form of heart failure will likely result in less severe discomfort. However, it is difficult to estimate in advance whether this will lead to a reduction in the discomfort scale.

Therapeutic intervention: since different forms of gene therapy will be used, different treatment regimes, including administration route, and single or repeated dosing, will apply. Therapies can be locally (intracardiac, epicardial injection) or systemically (e.g. s.c., i.p., i.m., i.v.) applied. Generally, in the PLN-R14del model interventions to initiate repair can be performed before onset of the disease, while therapeutic intervention is typically initiated after establishment of the disease. Gene therapy is dosed minimally as a single infusion and three different doses will be tested. Bodyweight, blood collection (e.g. tail vein, or check puncture), and cardiac function (3D/4D echocardiography, MRI) are typically performed on baseline and every 2-3 weeks until time of termination, but additional measurements may be included based on characteristics of the applied therapy (ranging from 4 to maximum 8 measurements). Electrophysiological measurements (ECG) are typically performed at baseline in 3-4 month old mice and in acutely stressed mice before and after treatments. Upon termination blood and tissues will be collected for further processing.

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

Substudy 1. Evaluation and optimising gene delivery strategies

For screening the **best-expressed constructs and delivery techniques (substudy 1)**, the primary outcome is whether animals have detectable gene and protein expression levels in the heart (yes/no) to allow for potential effect of therapeutic genes in substudies 2-4 (gene expression determined by qPCR, and protein expression determined by western blot). For statistics, we choose to compare treated vs control treated animals directly. With an estimated effect size of 1.4, power of 0.8, alpha of 0.05, and using a one-tailed t-test, n=8 is the minimum number per group required.

Here we will take into account:

1. Administration route of gene therapy: the success rate of intravenous and intra-cardiac injection performed by competent researchers is approximately 90%. To be properly powered 10% extra animals will be included in case of this administration route.

Therefore, the final group size will be **9 animals/group**.

Substudy 2. Evaluation of gene therapy for the treatment of PLN-R14del associated adverse **remodelling**.

This substudy is powered by the primary outcome parameter **remodelling** which will be determined by ECG under stress-inducing substances such as **remodelling**. For statistics, we choose to compare PLN-WT and PLN-R14del treated vs control treated animals directly. Based on earlier studies we defined the effect size of 0.6, power of 0.8, alpha of 0.05, and using ANOVA, n=9 is the minimum number per group required.

Group	Genotype	Treatment
1	PLN-WT	control
2	PLN-R14del	control
3	PLN-WT	gene therapy
4	PLN-R14del	gene therapy

The exact power calculation will depend on the used therapeutic approach (substudy 1) and method to induce cardiac stress (substudy 3). Here we will take into account:

1. Administration route of gene therapy: the success rate of intravenous and intra-cardiac injection performed by competent researchers is approximately 90%. To be properly powered 10% extra animals will be included in case of this administration route.
2. Placement of the ECG needles: the success rate of placement of the ECG needles and successful ECG measurement is approximately 90%. To be properly powered 10% extra animals will be included.

Therefore, the final group size will be **11 animals/group**.

Substudy 3. Refining the murine PLN-R14del model.

This substudy is powered by the primary outcome parameter Cardiac Fibrosis which will be determined by histology. Cardiac function, (End Diastolic Volume, End Systolic Volume, Ejection Fraction, and cardiac strain) and cardiac morphology (cardiomyocyte hypertrophy, PLN protein aggregates, fibrofatty replacement) will be used as secondary outcome parameters. For statistics, we choose to compare PLN-WT vs PLN-R14del with and without additional cardiac stressor. The following statistical calculation has been performed based on the percentage of cardiac fibrosis (pilot data presented above).

Power: 80%, Alpha: 0.05, estimated effect size $d = 0.5$

This gives $n = 10$ per group for 8 groups using ANOVA.

The exact power calculation will depend on the method to induce cardiac stress (substudy 3). Here we will take into account:

1. Exercise: the success rate for exercise is estimated at 15% due to animals refusing to run (Donner et al. J Vis Exp. 2014). To be properly powered 15% extra animals will be included. This gives a total of 12 animals per group.
2. TAC model: our lab's experience has shown that there is a 15% mortality rate as a result of the procedure, resulting in a total of 12 animals per group. To obtain an optimal window of opportunity for therapeutic intervention, sufficient pressure overload, and subsequent remodelling must be induced. Consequential to the heart failure development the mortality of this procedure is and remains 15%. In addition, the success rate of TAC placement is 90%. To be properly powered 10% extra animals will be included. This gives a total of 14 animals per group.

To rule out adverse effects of the surgical procedure 6 sham mice per group will be used.

Substudy 3A: voluntary exercise

Groups	genotype	cardiac stressor	number
1	PLN-WT	untreated	10
2	PLN-R14del	untreated	10
3	PLN-WT	voluntary exercise	10
4	PLN-R14del	voluntary exercise	10
Total			40

In case we don't observe substantial structural remodelling upon voluntary exercise we will continue to substudy 3B where forced exercise will be tested.

Substudy 3B: forced exercise

Groups	genotype	cardiac stressor	number
1	PLN-WT	untreated	10
2	PLN-R14del	untreated	10
3	PLN-WT	forced exercise	12

4	PLN-R14del	forced exercise	12
Total			44

In case we don't observe substantial structural remodelling upon voluntary exercise we will continue to substudy 3B where forced exercise will be tested.

Substudy 3C: pressure overload (TAC)

Groups	genotype	cardiac stressor	number
1	PLN-WT	untreated	10
2	PLN-R14del	untreated	10
3	PLN-WT	TAC	14
4	PLN-R14del	TAC	14
5	PLN-WT	sham	6
6	PLN-R14del	sham	6
Total			60

Substudy 4. Evaluation of gene therapy for the treatment of PLN-R14del associated adverse structural remodelling.

This substudy is powered by the primary outcome parameter [REDACTED] which will be determined by ultrasound or MRI. [REDACTED]

[REDACTED] will be used as secondary outcome parameters. For statistics, we choose to compare treated vs control treated animals directly. With an estimated effect size of 0.5, power of 0.8, alpha of 0.05, and using ANOVA, n=11 is the minimum number per group required to observe an existing difference statistically significant.

The exact power calculation will depend on the used therapeutic approach (substudy 1) and method to induce cardiac stress (substudy 3). Here we will take into account:

1. Administration route: the success rate of intravenous and intra-cardiac injection performed by competent researchers is approximately 90%. To be properly powered 10% extra animals will be included in case of this administration route.
2. Exercise: the success rate for exercise is estimated at 15% due to animals refusing to run (Donner et al. J Vis Exp. 2014). To be properly powered 15% extra animals will be included. This gives a total of 13 animals per group.
3. TAC model: Our lab's experience has shown that there is a 15% mortality rate as a result of the procedure, resulting in a total of 13 animals per group. To obtain an optimal window of opportunity for therapeutic intervention, sufficient pressure overload, and subsequent remodelling must be induced. Consequential to the heart failure development the mortality of this procedure is and remains 15%. In addition, the success rate of TAC placement is 90%. To be properly powered 10% extra animals will be included. This gives a total of 15 animals per group.

To rule out adverse effects of the surgical procedure 6 sham mice per group will be used.

Group	Genotype	Cardiac stressor	Treatment	Number
1	PLN-WT	untreated	control	13
2	PLN-R14del	untreated	control	13
3	PLN-WT	exercise/TAC	control	13/15
4	PLN-R14del	exercise/TAC	control	13/15
5	PLN-WT	untreated	gene therapy	13
6	PLN-R14del	untreated	gene therapy	13
7	PLN-WT	exercise/TAC	gene therapy	15/17
8	PLN-R14del	exercise/TAC	gene therapy	15/17
total				108/116

Therefore, the final group size will range from **13 to 17 animals/group**.

Note: All group sizes provided above are estimated numbers. The total number of animals used may depend on the number of groups, primary outcome variable and other factors that may be unknown at this point. For each study we will consult with a statistician if the correct sample size is used.

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	registered breeding	Adult (8+ weeks)	432	Male and female	no	C57BL/6J
2-4	Mouse	registered breeding	Adult (8+ weeks)	972	Male and female	yes	PLN/R14del
2-4	Mouse	registered breeding	Adult (8+ weeks)	972	Male and female	yes	PLN/WT

Provide justifications for these choices

Species	mouse
Origin	humanised PLN-R14del knock-in mouse models have been generated at the Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York.
Life stages	We will use adult mice (from 6/8 weeks onwards) for the purpose of this experiment
Number	Substudy 1. Optimising gene delivery strategies We will test different gene therapy delivery strategies as described. We will combine experiments as much as possible in order to use the least possible control groups. A typical experiment will comprise 4 groups, vehicle/vector control, ██████████ transgene with n=9 per group and 2 different administration routes resulting in 72

animals per experiment. Animals will be terminated on a single time point, which will be determined based on the characteristics of the used gene delivery system. We expect to perform these experiments 6 times to test 3 different AAV serotypes and 3 different LNP formulations, culminating in $72 \times 6 = 432$ animals.

Substudy 2. Evaluation of gene therapy for the treatment of PLN-R14del associated adverse [REDACTED] remodelling.

A typical experiment will comprise 4 groups of 11 animals. Animals will be terminated on a single time point following cardiac arrhythmia induction and ECG measurement. We expect to perform 10 gene therapy experiments (5x repair, 5x treatment), over the course of this project. The total number of animals for this substudy are $11 \text{ animals} \times 4 \text{ groups} \times 10 \text{ gene therapies} = 440$

Substudy 3. Refining the murine PLN-R14del model.

Although we power this study on the presence of cardiac fibrosis, which can only be visualised by histology, in order to reduce the number of animals, termination will be performed on a single time point only. Echocardiography will be used to determine cardiac strain, which reflects the heart's ability to relax and can be used as a surrogate marker for cardiac fibrosis. Echocardiography will generally be performed every 2 weeks. Based on the outcome of echocardiography measurements we can decide to continue or terminate the experiment. The maximum duration is 14 weeks post cardiac stressor. This experiment to refine the model will comprise of 3 substudies with substudy A of 40 animals, substudy B of 44 animals and substudy C of 60 animals, with a total of **144** animals.

Substudy 4. Evaluation of gene therapy for the treatment of PLN-R14del associated adverse structural remodelling.

A typical experiment will comprise 8 groups and maximal 136 animals will be included per experiment. We expect to test 10 gene therapy experiments (5x repair, 5x treatment) over the course of this project. The total number of animals for this substudy are $136 \times 10 \text{ gene therapies} = 1360$

Expected total number of animals: Based on the estimated numbers shown above we expect to use a maximum of **2376** animals for this 5-year project.

Gender	PLN cardiomyopathy is equally present in males and females. As we aim to represent the population as best as possible, we will use both sexes. Only in case we observe sex specific differences in gene therapy efficacy or acute or chronic remodelling we may opt to use a single sex
Genetic alterations	Knock-in of human PLN and PLN/R14del mutation
Strain	Wild type and transgenic mouse models. Mice provide the preferred animal model for this protocol because of the availability of different transgenic models that together comprehensively recapitulate the complex pathology of CVD diseases. *Other transgenic strains with relevance for PLN-R14del cardiomyopathy that become available during the course of this proposal may also be included during the course of this project.

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

By exception we may need to house animals individually. For instance, upon aggression within the group of animals it can be necessary to house animals individually. In addition, consequential to loss of animals during the experiment a single animal may remain. We will adhere to the AWB policy of individual housing and consult with the IVD at all times in case individual housing may occur.

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.

Adequate peri- and post operative pain relief is applied for at least 24 hours and longer if necessary, on advice of the designated veterinarian and AWB

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

Short-term adverse effects consequential to:

1. induction of cardiac stress: drowsiness and low activity due to recovery of anaesthesia.
2. forced exercise: shortness of breath, temporary low activity.
3. open thorax procedures (intramyocardial injection and TAC): low activity, reduced grooming, temporary weight loss.

Long-term adverse effects consequential to heart failure development: Impaired activity and movement, shortness of breath (due to fluid build-up in the lungs) and weight loss.

Explain why these effects may emerge.

Short-term: arrhythmias due to induction of cardiac stress. Stress consequential to electric shock in the forced exercise set-up. Consequently, to the surgery the animals may eat less in the first couple of days and temporarily lose body weight.

Long-term: consequential to the development of heart failure animals can become less active, experience shortness of breath and may start eating less and lose body weight.

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

Preventing these deleterious effects within the experiment is not possible as it is necessary for the experiment that the animals develop heart failure. However, we will closely monitor the animals, perform frequent weight checks and describe a clear humane endpoint as described below. In addition, injections

and surgeries will be performed by competent biotechnicians. Animals will receive post-surgical care according to the current gold standard (NCad Code of Practice Perioperative Care 2023). E.g., half of the cage is placed on a heat pad after surgery to allow faster recovery from the anaesthesia. Animals will receive high caloric wet food and appropriate analgesia, during this period the weight of the mice will also be monitored, and they will be checked for other signs of unordinary discomfort or longer if weight loss is still near HEP after more than 4 days or other signs are still observed.

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.

The humane endpoint is reached in case:

Clinical score sheet to monitor Heart failure development:

In general mice do not show clinical symptoms, including dyspnea and congestion, that are associated with heart failure development and could be used as a humane endpoint. We therefore defined surrogate markers for clinical heart failure symptoms using a clinical score sheet. The clinical score includes clinical symptoms (immobility, hunching, grooming, breathing), weight, and wound inspection when applicable. Clinical scoring will take place immediately before the ultrasound measurements and on the first 2 days post-surgery. When the clinical score surpasses a certain threshold, we either 1) contact the designated veterinarian to discuss possible treatment and intensify monitoring or 2) terminate the animal.

Indicate the likely incidence.

ECG measurements:

ECG in mice is generally considered to be a non-invasive procedure with a low risk of causing significant distress or harm. However, we could expect 5% mortality during ECG testing with adrenergic stimulators.

TAC model: 15% mortality is the expected maximal mortality of the studies, consequential to both the surgical procedure and the development of heart failure. Of the 15% we expect 5% mortality is caused consequential to the surgery (<7 days) and another 10% to the development of heart failure (>7 days). (humane endpoint).

PLN-R14del cardiomyopathy: As the model requires further refinement to better mimic the human PLN cardiomyopathy we cannot provide a calculated number. We anticipate the incidence will be similar, or slightly higher in PLN-R14del mice compared to other strains or wildtype animals exposed to TAC and estimate 40% to reach a humane endpoint based on heart failure development.

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).

	Procedure	Severity
1	Systemic delivery of viral vectors or	Mild
2	Local delivery of gene therapy vectors by open chest injection	Moderate
3	ECG recordings	Mild
4	Echocardiography recordings	Mild
5	Phenotype induction by voluntary running wheel	Mild
6	Phenotype induction by Exercise (forced)	Severe
7	Phenotype induction by TAC surgery	Moderate
8	Individual housing*	Moderate

Different procedures can be combined in different substudies. Discomfort for forced exercise is depending on frequency and duration of exercise. In the table below we provide an overview on the possible combinations per substudy and the cumulative maximal severity. *By exception we may need to house animals individually (e.g. due to fighting in a cage). We will adhere to the AWB policy of individual housing and consult with the IVD at all times in case individual housing may occur.

Substudy	Procedures	Cumulative severity
1	1	Mild
	2	Moderate
2	1 and 3	Mild
	2 and 3	Moderate
3	4 and 5	Mild
	4 and 6	Severe
	4 and 7	Moderate
4	1, 3, 4 and 5	Mild
	2, 3, 4 and 5	Moderate
	1, 3, 4, and 6	Severe
	2, 3, 4 and 6	Severe
	1, 3, 4, and 7	Moderate
	2, 3, 4 and 7	Severe

In the table below the distribution of discomfort for the different substudies. Procedural and model related mortality and consequential moderate discomfort are taken into account. Of note: based on the outcome of substudy 1 we will decide to apply the gene therapy systemically or locally, either being mild or moderate discomfort respectively. For the calculator below we used local intramyocardial injection, with consequential moderate discomfort, as the route of administration. In addition, in substudy 2 and 4, 50% of

the animals will undergo cardioprotective treatment which is expected to decrease the severity of adverse cardiac remodelling. Consequential to decreased remodelling it is expected that these animals will develop less severe heart failure. The milder form of heart failure will likely result in less discomfort. However, as it is difficult to estimate in advance and whether this will lead to a reduction in the discomfort scale (from moderate to mild) we decided to scale discomfort as **severe for all animals that undergo forced exercise** or moderate for all animals that undergo TAC.

Substudy	Non-recovery		Mild		Moderate		Severe		Total
	number	%	number	%	number	%	number	%	
1	0	0%	216	50%	216	50%	0	0	432
2	0	0%	0	0%	440	100%	0	0	440
3	0	0%	0	0%	94	65%	50	35%	144
4	0	0%	0	0%	816	60%	544	40%	1360
Total	0	0%	216	9.1%	1566	65.9%	594	25%	2376

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	We perform as much of the preliminary work as possible with non-animal models, such as evaluating the infectivity of the viral vectors and the functionality of the transgenes in cell lines and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. In addition, we perform <i>in silico</i> studies to optimise transgene properties. Yet despite the advancements in these models, they can, at present, not entirely replace our need for animal studies. This relates to the complexity of the <i>in vivo</i> system, where different cell types play important roles in heart rhythm regulation. Their interaction, relative positions and organ structures all contribute to the function and dysfunction of this system. As a result, animal testing remains essential to achieve our research goals.
Reduction	The optimization of the viral vector-mediated gene transfer and the choice of therapeutic genes will first be evaluated <i>in vitro</i> . This will allow us to keep the number of experimental groups down by selecting the best gene construct (high expression, high functionality, absent or minimal off-target effects). We will continuously aim to further reduce the number of experimental groups, or reduce the number of animals per group (e.g. by collecting multiple samples from a single animal and combining control groups if possible) and will take additional information from our or published studies into account, once available.
Refinement	The surgical techniques used are performed regularly by competent biotechnicians. Mice are housed in a group as much as possible, in cages supplemented with enrichment. Mice will be operated on under aseptic conditions and a heat mat will be used after surgery for 24 hours. In addition, with clearly defined humane endpoints and frequent monitoring, using clinical score sheets, unwanted additional discomfort is kept to a minimum. As part of this project we aim to further refine the hPLNR14del

model in order for it to better mimic the clinical presentation as seen in human patients. Further surgical refinement of our models will be limited, but we will be able to refine our read-outs for cardiac function.

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.

H

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.

Click or tap here to enter text.

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.

Organs, tissues and cells will be harvested for described analyses.

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.

Overdose of anaesthesia

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

Click or tap here to enter text.

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

Click or tap here to enter text.



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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	2	<i>Characterization of [redacted] pigs phenotype and possibilities for gene therapy approaches in pigs</i>

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.

As outlined in the project proposal and in line with the description of the overall project strategy (3.4.1), we aim to use a large animal model of PLN-[redacted] cardiomyopathy to evaluate the delivery effectiveness of potential therapeutics in a preclinical setting that more closely resembles the human disease state. [redacted] pigs have been recently generated, and our objectives in this study will be first to perform a comprehensive characterization of the pig model (Substudy 1), and subsequently to evaluate delivery strategies and effectiveness (Substudy 2).

Substudy 5. Comprehensive characterization of [REDACTED] Pigs

A comprehensive characterization of the [REDACTED] pig model will involve multiple analyses and assessments, such as: 1) evaluating cardiac function using electrocardiography (ECG), echocardiography, cardiac magnetic resonance imaging (MRI), and PV loop; 2) conducting histological analysis of heart tissue samples to examine the structural changes associated with the disease; 3) carrying out molecular analysis of heart tissue to identify changes in gene expression or protein levels associated with the disease.; 4) characterising the inflammatory response and immune cell infiltration in heart tissue to understand the role of inflammation in disease progression. **Primary outcome parameter:** functional remodelling of the heart. Structural remodelling, assessed by both functional measurements and post-mortem analysis of cardiac tissue, will be used as secondary outcome parameters.

Figure 1. Modelling PLN cardiomyopathy in hPLN-R14del pigs.

[REDACTED] pigs will undergo a comprehensive characterization to identify clinical, structural and molecular evidence of PLN-R14del cardiomyopathy (substudy 1 for this appendix and substudy 5 in the entire project). Furthermore, the study will explore and compare different gene therapy strategies, both viral and non-viral vectors, and different administration routes, in [REDACTED] pigs in comparison to untreated animals (substudy 2 for this appendix and substudy 6 in the entire project).

Substudy 6. Testing gene therapy strategies, delivery approaches and effectiveness.

To achieve the highest efficiency of transduction and expression, different vectors including AAV6, 2i8, 9, and different LNP formulations can be employed. With our gene therapy strategies we aim to prevent PLN cardiomyopathy by repairing the genetic defect (gene editing) and to treat the established disease [REDACTED]. In earlier pilot studies we have shown efficient transfection of cardiomyocytes both *in vitro* and *in vivo*, using the AAV vectors [REDACTED]. These vectors will be used as our starting point for the mouse studies in appendix 1 and we aim to further optimise them using different promoters and/or transgenes, alternative delivery routes and co-administration of immunosuppressant drugs. Based on *in vitro* work and the mouse experiments the best performing gene therapies will be tested in pigs. In the table below we give an overview of possible promoters, transgenes and delivery methods that may be used. For gene therapy, we specifically choose to make use of AAV vectors as these are well known to efficiently target the heart but

have very low biosafety risk. For non-viral gene delivery, we will make use of lipid nanoparticle formulations. The aqueous core of the lipid nanoparticle allows the packaging of drugs into the particle. As such, LNPs can be manufactured to contain a specific therapeutic entity or to target a specific site/cell type. All viral and non-viral vectors used will be first validated for efficacy and efficiency in the in vitro setting using iPSC PLN-R14del cardiomyocytes. A detailed description of experimental procedures is provided in the section below.

Primary outcome parameter: Transgene-positive cardiomyocytes in combination with upregulation of the target gene or genome correction frequency.

Possible gene delivery strategies			
vector	promotor	transgene	delivery route
			systemic, local
LNPs	-		systemic, local

Strategy and go/no decisions

For each substudy clear go/no go decisions have been defined, which are presented in figure 2 below.

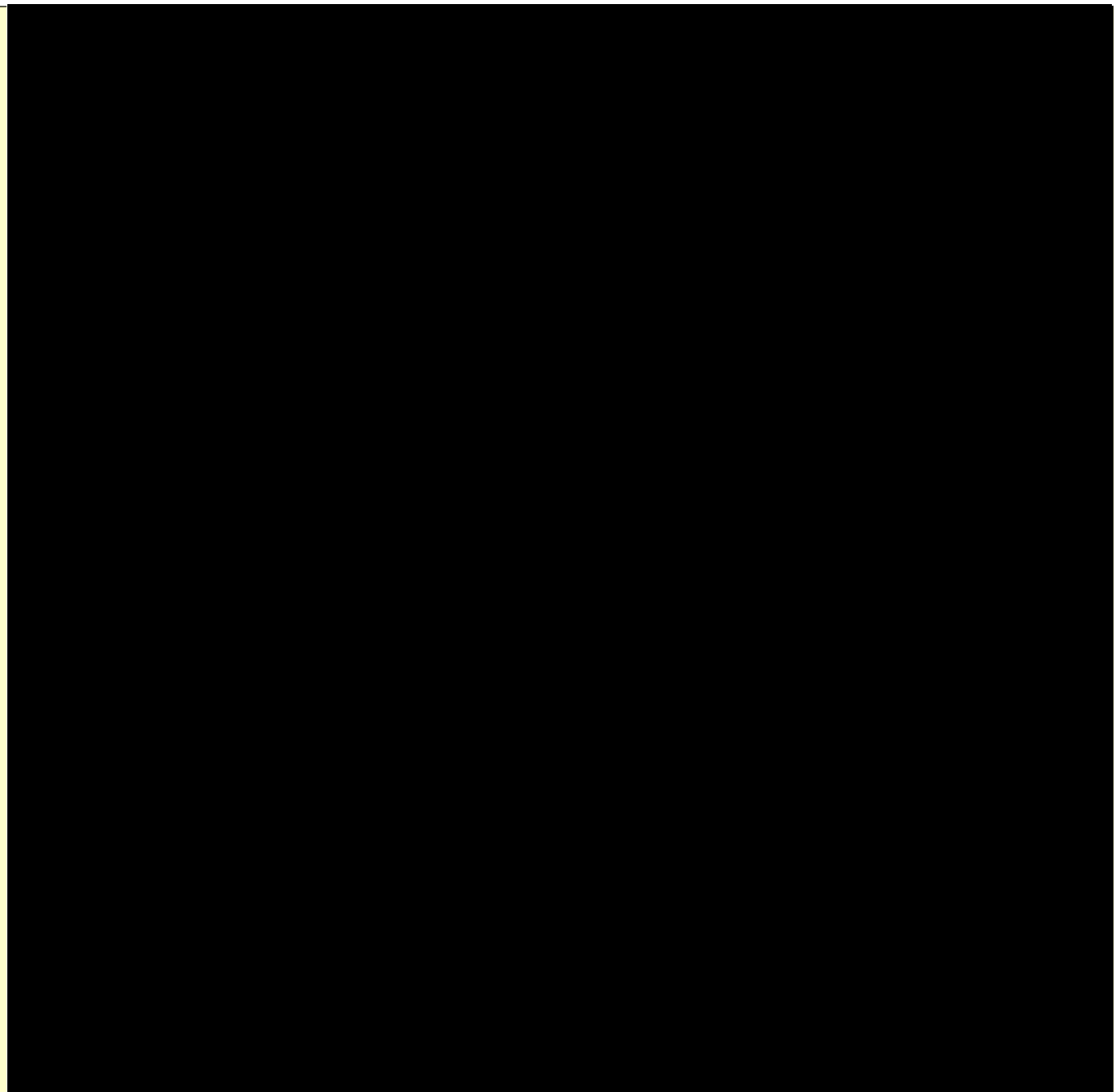


Figure 2. *schematic overview presenting the go/no go decision for each substudy. Substudies 1 to 4 in mice are described in detail in appendix 1.*

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

Substudy 5. Comprehensive characterization of [REDACTED] Pigs

1. Baseline body weight and cardiac function measurement by ECG, echocardiography and MRI under anaesthesia (in agreement with the designated veterinarian). Cardiac function measurements (ECG and echocardiography) are typically performed every 2 weeks starting from baseline to termination. Cardiac MRI is able to detect more subtle changes compared to echo. We aim to measure cardiac function with echocardiography mostly, but when we think it is necessary, we can

opt to perform cardiac MRI. Blood sampling in a conscious animal will be performed during follow-up to measure cardiac enzymes.

- a. **Electrocardiography (ECG):** Animals will be anaesthetised (in agreement with the designated veterinarian) and positioned for ECG measurements. Electrodes are placed on the skin in specific locations to capture the electrical activity of the heart. In pigs, the most common placement is to place the positive electrode on the right side of the chest, just behind the elbow, and the negative electrode on the left side of the chest, just behind the shoulder. The ground electrode is placed on the pig's back. The electrodes are connected to the ECG machine, and ECG is recorded for at least 10 seconds to obtain a complete ECG waveform.
 - b. **Non-invasive echocardiography studies:** Animals will be sedated, anaesthetised, immobilised on the operation table, attached to vital signs monitoring (body temperature, ECG), intubated and ventilated. Pigs are positioned in the right lateral position for transthoracic echocardiography (TTE) or transesophageal echocardiography (TEE). Duration: 30 minutes; Justification: Least invasive and quickest method for assessing cardiac function and morphology.
 - c. **MRI to assess cardiac function and remodelling:** Animals will be sedated, anaesthetised, immobilised on the operation table, attached to vital signs monitoring (body temperature, ECG), intubated and ventilated. MRI scans will be performed after transport to a specialised facility (Veterinary medicine, UU, on campus).
 - d. **Blood collection:** blood will typically be collected from the jugular vein in sedated animals at the time of cardiac function assessment (ECG/echo/MRI). In case additional sampling in between cardiac function measurement is required we can opt for blood sampling by 1. venipuncture from the ear veins, or 2. a central external line. The latter applies when larger volumes or a higher frequency of blood samples is required. A central external line in the neck connected to the jugular vein allowing easy and convenient blood sampling in a conscious animal during follow-up before termination. The central line will be regularly flushed to prevent clogging of the line and risk for infection. In case the central line is not accessible any more during the course of the experiment it will be removed, and further blood sampling will be performed by venipuncture of the ear veins. Blood will be collected in parallel to functional measurements to assess the presence of cardiac damage markers (including nt-proBNP and cardiac troponin).
2. Terminal experiment under anaesthesia; collect blood and organs for lab analysis. Time of termination will be depending on the degree of adverse cardiac remodelling observed. The degree of remodelling will be determined based on ECG and echocardiography measurement. In case of sufficient remodelling the animal will be terminated within a week after the last measurement. In case the degree of remodelling is not sufficient animals will be kept in experiment and cardiac function measurements will be performed again 2 weeks later. The degree and severity of cardiac remodelling will be based on available clinical criteria (Corrado et al. JAHA 2021, McDonagh et al. European Heart Journal 2021) for arrhythmogenic cardiomyopathy (ECG; repolarization abnormalities, arrhythmias), LV functional abnormalities (Echo, LVEF below 40%, End Systolic and End Diastolic Volumes) and cardiac damage markers in circulation (nt-proBNP, cardiac troponin).
 3. We aim to include 3 different time points for termination (early, intermediate and late) to assess the degree of structural cardiac remodelling (using histology). We will start the experiment with the late time point and anticipate that substantial structural and functional remodelling is evident within 20 weeks. In case no substantial remodelling is evident after this time a no-go criterium (**go/no-go #5**) is reached, and the project stopped. In consultation with the animal welfare body possibilities for model refinement will be assessed and included in a new CCD project proposal.

Substudy 6. Testing gene therapy strategies, delivery approaches and effectiveness.

1. Delivery of therapeutic transgenes
 - a. **Systemic delivery of gene therapy vectors:** After sedation the animal will receive the vector solutions via intravenous (i.v.) or intramuscular (i.m.) injection.
 - b. **Local delivery of viral vectors into the myocardium (open chest):** Surgery will be performed under sterile conditions. Animals will be sedated, anaesthetised, immobilised on the operation table, attached to vital signs monitoring (body temperature, ECG), intubated and ventilated. Access to the heart will be achieved either via intercostal access between the third and fourth rib to expose the apex of the heart or via sternotomy to expose the high ventral and atrial areas. A precision injection syringe (Hamilton) equipped with an ultrathin 28G or 30G injection needle will be used to reach the desired location within the heart and inject a maximum of 1 ml at a maximum of 20 individual injection sites. Alternatively, a maximum of 5 ml virus suspension will be injected into the epicardial sac.
2. Terminal experiment under anaesthesia; collect blood and organs for lab analysis. Time of termination will be depending on characteristics of the used gene therapy, but typically between 2- and 14-days post injection.

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

Substudy 5. Comprehensive characterization of [REDACTED] Pigs

In order to use as little animals as possible, we aim to collect as much information as possible from each animal. This means that we collect both functional (ECG, Echo, MRI) and structural measurements (blood, tissue etc). Since we don't know if and how these animals will develop a severe phenotype we cannot perform a power calculation. We therefore will start this experiment as a pilot experiment using 10 animals per group and 3 time points for termination. We will perform sequential analysis to allow proper powering of the study.

Substudy 6. Testing gene therapy strategies, delivery approaches and effectiveness.

For screening the best-expressed constructs and delivery techniques, the primary outcome is whether animals have detectable gene and protein expression levels in the heart (yes/no) (gene expression determined by qPCR, and protein expression determined by western blot). For statistics, we choose to compare treated vs control treated animals directly. For these pilot studies we aim to use 4 animals per group.

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
5	pig	registered breeding	Adult	60	Male and female	Yes	[REDACTED]
6	pig	registered breeding	Adult	96	Male	No	Landrace pig

Provide justifications for these choices

Species	Wild type and transgenic pig models. Pigs provide the preferred animal model for this protocol because of the availability of different transgenic models that together comprehensively recapitulate the complex pathology of CVD diseases. Moreover, CVD are typically highly comparable between pigs and humans [J AM Assoc Lab Anim Sci, 2014; 53(5): 432-438].
Origin	Our wildtype pigs are provided by Van Beek (Lelystad), they provide animals that are consistent in growth and health and have excellent SPF status. Transgenic pigs are currently being bred in Germany and will be transferred to a certified breeder once available.
Life stages	We will use adult pigs (from 4 to 6 months old, less than 100 kg).
Number	<p>Depending on the study's progress, a maximum of 156 animals will be used for the whole study. The estimated numbers for each substudy are shown below.</p> <p>Substudy 5. Comprehensive characterization of P [REDACTED] Pigs In order to thoroughly investigate the [REDACTED] pig model and evaluate various gene therapy delivery strategies, we will conduct a comprehensive characterization using multiple analyses and assessments, as outlined previously. Each experiment will consist of two groups (wild-type and [REDACTED]), with a group size of n=10. Animals will be terminated at three time points, 1) early, 2) intermediate and 3) late-stage cardiac remodelling. After finalising the experiment, a proper power calculation will be performed to assess if additional animals need to be included in the experiment. Thus, we estimate that a total of 60 animals will be required to accomplish our objectives.</p> <p>Substudy 6. Testing gene therapy strategies, delivery approaches and effectiveness. We will test different gene therapy delivery strategies as described. We will combine experiments as much as possible in order to use the least possible control groups. A typical experiment will comprise 4 groups, vehicle/vector control, PLN, I1c and PE transgene with n=4 per group and 2 different administration routes resulting in 32 animals per experiment. Animals will be terminated on a single time point, which will be determined based on the characteristics of the used gene delivery system. We will select the 3 best performing gene therapy approaches derived from the mouse studies and test these in the pigs, culminating in 32 x 3 = 96 animals.</p>
Gender	For the characterization of the [REDACTED] pigs we aim to use both sexes. However, as male pigs tend to be more aggressive and more difficult to handle due to their size as they grow, we may opt to only use female pigs in case the onset of disease is late, and progression of disease is slow. For testing of gene therapy strategies, we will only use female pigs.
Genetic alterations	[REDACTED]
Strain	Landrace pig

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

Before the experiments, the animals will be housed in groups and remain housed in groups when possible. When required animals will be equipped with blood catheters making individual housing necessary. Otherwise, the pigs will nibble on and potentially damage one another's catheters, which might prevent blood sampling and subsequent failure of the experiment. After surgery for local gene-therapy delivery animals will be housed individually to avoid stress and allow administration of medication. These individual animals will be housed in the same room with other animals and will be able to hear, smell and see and touch the other pigs.

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.

Surgical procedures as well as ECG, MRI and ECG measurements will be performed when animals are under complete anaesthesia. Adequate peri- and postoperative pain relief will be given.

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

Short-term adverse effects consequential to:

1. induction of cardiac stress: drowsiness and low activity due to recovery of anaesthesia.
2. fasting prior to surgery
3. open thorax procedures (intramyocardial injection): low activity, reduced grooming, temporary weight loss.

Long-term adverse effects consequential to heart failure development: Impaired activity and movement, shortness of breath (due to fluid build-up in the lungs), no eating/drinking and weight loss.

Explain why these effects may emerge.

Short-term: arrhythmias due to induction of cardiac stress. Consequently, to the surgery the animals may eat less in the first couple of days and temporarily lose body weight.

Long-term: consequential to the development of heart failure animals can become less active, experience shortness of breath and may start eating less and lose body weight.

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

Preventing these deleterious effects within the experiment is not possible as it is necessary for the experiment that the animals develop heart failure. To make sure that potential suffering is limited to the minimum, definition and monitoring of a good humane endpoint is essential.

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.

Clinical score sheet to monitor Heart failure development:

We will use a clinical score sheet to monitor heart failure development, which will include clinical symptoms (immobility, breathing), weight, and wound inspection when applicable. Clinical scoring will take place immediately before the ultrasound measurements, on the first 2 days post-surgery and regularly during follow-up. When the clinical score surpasses a certain threshold, we either 1) contact the designated veterinarian to discuss possible treatment and intensify monitoring or 2) terminate the animal

Indicate the likely incidence.

PLN-██████ cardiomyopathy.

We don't know yet whether ████████ pigs will develop evident clinical signs of heart failure. We anticipate the incidence will be similar, or slightly higher in ████████ pigs compared to other strains or wildtype animals, and estimate 20% to reach a humane endpoint based on heart failure development.

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).

	Procedure	Severity
1	Non-invasive echocardiography studies	Mild
2	ECG	Mild
3	MRI	Moderate
4	Blood sampling	Mild
5	Induction of PLN phenotype	Moderate
6	Systemic delivery of viral vectors	Mild
7	Local delivery of viral vectors by surgical open-chest access the heart	Moderate

Of note: We anticipate the discomfort consequential to the induced phenotype will be mild, however to prevent underestimation of the discomfort we list it as moderate. In case the animals, contrary to our expectations, show a severe phenotype we will stop the study and get back to the CCD/DEC for new ethical consideration.

In the table below the distribution of the combination of procedures for the different substudies.

Substudy	Procedure	Frequency	Cumulative maximal discomfort
----------	-----------	-----------	-------------------------------

5	1 to 5	multiple	Moderate
6	4, 6	single	Mild
	4, 7	single	Moderate

In the table below the distribution of discomfort for the different substudies. Discomfort related to individual housing, as well as procedural and model related mortality and consequential severe discomfort are taken into account. For the calculator below we used MRI and local intramyocardial injection, with consequential moderate discomfort, as used imaging technique and the route of administration respectively.

Substudy	Non-recovery		Mild		Moderate		Severe		Total
	Number	%	Number	%	Number	%	Number	%	
5	0	0%	0	0%	48	80%	12	20%	60
6	0	0%	48	50%	36	37.5%	12	12.5%	96
Total	0	0%	48	30.8%	84	53.9%	24	15.4%	156

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	We perform as much of the preliminary work as possible with non-animal models, such as evaluating the infectivity of the viral vectors and the functionality of the transgenes in cell lines and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. In addition, we perform <i>in silico</i> studies to optimise transgene properties. Yet despite the advancements in these models, they can, at present, not entirely replace our need for animal studies. This relates to the complexity of the <i>in vivo</i> system, where different cell types play important roles in heart rhythm regulation. Their interaction, relative positions and organ structures all contribute to the function and dysfunction of this system. As a result, animal testing remains essential to achieve our research goals.
Reduction	The optimization of the viral vector-mediated gene transfer and the choice of therapeutic genes will first be evaluated <i>in vitro</i> . This will allow us to keep the number of experimental groups down by selecting the best gene construct (high expression, high functionality, absent or minimal off-target effects). We will continuously aim to reduce the number of experimental groups further, or reduce the number of animals per group (e.g., by collecting multiple samples from a single animal and combining control groups if possible) and will take additional information from our or published studies into account, once available.
Refinement	For each action the pig will be taken from their own environment for the shortest amount of time possible to make sure that discomfort and stress from handling and

experimental procedures will be kept at a minimum. Experienced technicians will perform the experiment. Animals will receive pre- and post-operative care and adequate pain relief. Animals will also be routinely observed to evaluate discomfort. With clearly defined humane endpoints and frequent monitoring, using clinical score sheets, unwanted additional discomfort is kept to a minimum.

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.

H

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.

Click or tap here to enter text.

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.

Organs, tissues and cells will be harvested for described analyses.

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.

Exsanguination during deep anaesthesia.

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

Click or tap here to enter text.

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

Click or tap here to enter text.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD11500202216225 ~~Oude versie is herschreven en oude tekst wordt doorgestreepd getoond~~ **De herschreven versie heeft bij DEC-Utrecht het nummer 475 gekregen, vanwege communicatie met een nieuwe verantwoordelijk onderzoeker.**

2. Titel van het project : ~~New therapeutic strategies to prevent acute injury after myocardial infarction~~ Gene therapy for PLN-R14del-induced cardiomyopathy.

3. Titel van de NTS : ~~Ontwikkeling van gentherapie voor erfelijke hartziekten~~ Gentherapie tijdens geïsoleerde hartperfusie voor de behandeling van erfelijke hartziekten.

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: ~~11-7-2022~~ 16-6-2023
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: ~~13-7-2022 / 19-10-2022~~ 21-6-2023 / 19-7-2023
 anderszins behandeld: ~~Gesprek op 13-07-2022 en 19-10-2022~~
 termijnonderbreking(en) van / tot : ~~20-7-2022 / 23-9-2022~~ 26-6-2023 / 5-7-2023 en 25-7-2023 / 19-9-2023
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: 8-11-2022
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: ~~7-11-2022~~ 25-9-2023

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

~~8. Eventueel horen van aanvrager~~

- ~~— Datum: 13-7-2022
 — Plaats: online via Teams
 — Aantal aanwezige DEC leden: 7
 — Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker
 — Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC licht toe dat de aanvraag in de huidige vorm niet te beoordelen is en herschreven moet worden. Onderzoeker zal de aanvraag naar aanleiding van de mondelinge en schriftelijke vragen herschrijven.~~

~~— Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.~~

8. Eventueel horen van aanvrager

- ~~— Datum: 19-10-2022~~
- ~~— Plaats: online via Teams~~
- ~~— Aantal aanwezige DEC-leden: 7~~
- ~~— Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker~~
- ~~— De DEC heeft de onderzoeker gehoord.~~

9. Correspondentie met de aanvrager

- ~~— Datum vragen: 20-07-2022~~
- ~~— Datum antwoord: 23-09-2022~~
- ~~— Gestelde vragen en antwoorden zijn te vinden in het vorige advies:~~
- ~~— De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.~~

De DEC heeft op 7-11-2022 het advies aan de CCD uitgebracht, dat de aanvraag niet beoordeelbaar is.

8b. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 21-6-2023
- Plaats: online via Teams
- Aantal aanwezige DEC-leden: 7
- Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over

- Ga je bij patiënten, die cardiomyopathie hebben als gevolg van het genetisch defect, proberen het defect te repareren en ga je patiënten, die door middel van verwantenonderzoek als drager aan het licht zijn gekomen, preventief behandelen?

Antwoord: Ja, het is het doel van dit onderzoek om die twee te onderzoeken; reparatie om progressie te verminderen en reparatie om te voorkomen dat de ziekte zich ontwikkelt.

- O.a. in de go-no go flowchart is 'een significant verschil' niet specifiek benoemd.

Antwoord: We willen een significant verschil zien op de primaire uitkomstmaat, die we definiëren per experiment. Dat hoeft niet significant verschillend te zijn. Het zal afhangen van wat we willen zien en zal in overleg gebeuren met de IvD.

- De IvD verbetert: wat is voor jullie het biologisch relevant verschil?

Antwoord: Dat is verschillend per experiment. In de vroege fase kijken we naar elektrofysiologische veranderingen en willen we een significante vermindering zien van [REDACTED] In een later stadium kijken we naar hartfunctiemetingen [REDACTED]

- Subdoel 3 is optimalisatie van het transgene model. Uit toelichting van de IvD (niet uit de aanvraag) is duidelijk, dat het model geen goed fenotype uit zichzelf ontwikkelt en dat je het dier zich moet laten inspannen of dat je het moet opereren. Worden de modellen a, b, en c parallel uitgevoerd of zou het na elkaar kunnen, omdat a milder lijkt?

Antwoord: Wij willen dit parallel doen om het met elkaar te kunnen vergelijken en zullen nadenken over of het na elkaar kan.

- Denken jullie dan ook aan verschillen in aantallen dieren en ongerief?

Antwoord, Ja.

- In de aanvraag wordt over behandeling en preventie gesproken, maar in de kliniek zal het in de toekomst vooral over preventie gaan. Hoeveel mensen komen naar de kliniek met symptomen en hoeveel carriers komen waarschijnlijk niet naar de kliniek? Is het gepast om een heel model op te zetten (muis en varken) om een behandeling te ontwikkelen? Tegen de tijd dat een behandelingsstrategie kan worden geïmplementeerd, kun je je misschien beperken tot de preventieve strategie. De afdeling Klinische Genetica zoekt ondertussen met de actieve PLN patiëntenvereniging alle carriers op.

Antwoord: Er is altijd een patiënt-0, die binnenkomt met dit fenotype, die je wilt behandelen. Nu zou iemand alleen geholpen zijn met een harttransplantatie (niet echt curatief). Bovendien zullen de resultaten gebruikt kunnen worden voor het behandelen van andere cardiomyopathieën dan PLN.

- Kunt u in de aanvraag beter rechtvaardigen, waarom u voor de behandelingsstrategie kiest?

Hieruit zijn onderstaande vragen voortgekomen die schriftelijk aan de onderzoeker worden voorgelegd.

9b. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 26-6-2023 en 25-7-2023
- Datum antwoord: 5-7-2023 en 19-9-2023
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

De DEC heeft uw NTS en projectaanvraag op 21-6-2023 beoordeeld en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen.

Algemeen

Uw aanvraag betreft zowel een preventieve (dragers) als een curatieve (patiënten) toepassing. Om een goede schade baten afweging te maken over met name de curatieve toepassing, heeft de DEC meer informatie nodig over de verwachte ontwikkelingen in het aantal patiënten dat in aanmerking komt voor deze therapie. De DEC vraagt u om deze ontwikkeling te schetsen aan de hand van de volgende punten:

- Kunt u aangeven wat het aantal patiënten is dat baat zou hebben bij een therapeutische behandeling?

Antwoord: Genetic arrhythmogenic cardiomyopathy has a prevalence of approximately 1:5000 (0.002%), is characterized by life-threatening ventricular arrhythmias and sudden cardiac death (SCD)

in apparently healthy young adults. The exact prevalence of PLN cardiomyopathy has not been extensively studied, but a population-based cohort study in Groningen suggests a prevalence of 1:1400 (0.007%). Since we know the founder mutation of PLN originates in the North of the Netherlands this population may be relatively enriched for the PLN mutation. This may also hold true for other regions in the Netherlands or abroad, but we do not know that at this time. In the Netherlands the PLN-R14del genetic variant is the most prevalent cardiomyopathy-related mutation present in ~15% of patients with arrhythmogenic or dilated cardiomyopathy. As for numbers, a rough estimation based on the numbers provided above, we may expect the number of PLN carriers in the Netherlands somewhere between ≈ 34.000 to 119.000 . A recent Dutch cohort study describes a ratio of 85% carriers and 15% (index)patients in an existing patient cohort. These numbers translate to $\approx 5.100 - 17.850$ patients to treat in the Netherlands alone. Next to the Netherlands, PLN cardiomyopathy has been identified in other European countries, USA, Canada, Japan and China. In addition, we can expect not all PLN relatives will choose for genetic testing, and not all patients with ACM and/or DCM will be checked for the PLN mutation.

- De verhouding dragers/patiënten nu en in 2033 (wanneer de therapie naar verwachting beschikbaar komt?)

Antwoord: A recent Dutch cohort study describes a ratio of 85% carriers and 15% (index) patients in an existing patient cohort (Verstraelen et al. EHJ 2021). Currently approximately 1500 people have been diagnosed as PLN carriers in the Netherlands alone and thousands are still unidentified. We find it very difficult to estimate with which degree the number of index carriers will go down when we start treating carriers. Yes, in the identified families it can be expected this will significantly reduce the number of patients. However, we need to consider that not all carriers will choose for a gene-editing therapy, and the gene-editing therapy may not be efficient in all carriers. In fact, no large-scale clinical trials are available that assess the efficacy of gene-editing in cardiomyopathy patients yet. On the other hand, the PLN cardiomyopathy has only been recently discovered, and it is expected a large group of families carrying the disease have not been identified yet. Moreover, none of the experts in the field has made an estimate on the reduction in genetic cardiomyopathies patients once gene-therapy is introduced. Altogether it is very difficult to estimate to which extent, and at which rate the number of patients will decline over the next decades. If in the next decades, the number of patients rapidly decreases due to a successful preventive strategy, the next research projects will take this into account. However, for the current project of 5 years we will need the curative model as well.

- De mogelijkheid voor klinisch genetici om zelf familieleden te benaderen (Richtlijn Informeren Familieleden)

Antwoord: The principal investigators of this project are not clinical geneticists, nonetheless we try to answer this question to the best of our abilities. In the Netherlands a guideline is in place on informing family members of the index patient. The PLN mutation is an autosomal dominant inheritable mutation, which indicates first-degree relatives and further-degree relatives with a 50% risk of inheriting the disease should be informed. Relatives need to be informed on their risk and possible impact on their quality of life and life expectancy. In addition, relatives are informed on the cost of clinical testing which they partially must pay themselves (own-risk budget). The relatives of the

index patients still can decide not to proceed with further testing and may develop disease later in life. In the ideal world this approach would result in the identification of all PLN carriers in the Netherlands. However, we need to consider that new index patients in previously non-identified families will still be diagnosed. This diagnosis will most likely occur after a patient presents with clinical symptoms in the hospital and thus in the presence of disease. Furthermore, PLN cardiomyopathy is not restricted to the Netherlands, but has been identified in other European countries, USA, Canada, Japan and China. What the guidelines on informing relatives at risk are in those countries is not clear to us but are likely not as well defined as the Dutch guidelines.

- De impact van deze therapie op andere dragers/patiënten met een andere mutatie dan PLN-R14del.

Antwoord: Gene therapy holds great potential as a targeted treatment option for a variety of genetic cardiomyopathies caused by specific gene mutations that are critical for normal heart function. Its goal is to correct or compensate for the underlying genetic abnormalities that contribute to cardiomyopathies. By focusing on the precise genetic cause of each cardiomyopathy, gene therapy can offer personalized and accurate treatment approaches. Nonetheless, it is important to note that gene therapy for cardiomyopathies is still an emerging field, and several challenges must be addressed. These challenges include refining delivery methods, ensuring sustained gene expression over the long term, managing immune responses, and determining the optimal timing and dosage for gene therapy interventions. This project aims to comprehensively evaluate these aspects of gene therapy, which could have implications for other cardiomyopathies caused by gene mutations. Through a systematic examination of these factors, our project aims to contribute to the development of effective and safe gene therapy strategies for cardiomyopathies, thereby advancing the field and bringing us closer to offering targeted and personalized treatments for patients with genetic cardiomyopathies.

- Als het niet om PLN-R14del-patiënten gaat, de ziektebeelden/mutaties die baat hebben bij de kennis uit uw onderzoek?

Antwoord: The knowledge obtained from our research on gene therapy for PLN-R14del cardiomyopathy may have implications and potential benefits for other genetic cardiomyopathies. For instance, beyond the PLN-R14del mutation, there are other mutations in the PLN gene that can cause cardiomyopathy. By understanding the therapeutic effects and approaches specific to PLN-R14del cardiomyopathy, valuable insights can be gained for potential treatments targeting other PLN mutations. Additionally, numerous genetic cardiomyopathies share similar clinical features, such as dilated cardiomyopathy or arrhythmogenic cardiomyopathy. The knowledge obtained from studying PLN-R14del cardiomyopathy could provide valuable insights into the underlying mechanisms and potential therapeutic strategies for these similar conditions. Moreover, as PLN is involved in calcium regulation, understanding the gene therapy approaches for PLN-R14del cardiomyopathy may inform the development of therapies for other gene mutations affecting calcium handling. Lastly, the delivery methods, immune responses, and dosage optimization investigated in the context of PLN-R14del cardiomyopathy could have broader applications in gene therapy for various cardiovascular disorders beyond cardiomyopathies, such as inherited arrhythmias or vascular diseases.

We have added a summary highlighting the expected benefits outside the scope of this proposal to the project proposal background.

Projectvoorstel

3.4 Strategie

- Bij de criteria van de go/no go's wordt gerefereerd aan significante verbetering. Kunt u hier duidelijker onderbouwde cut-offs geven of de definitie 'significant' toelichten?

Antwoord: We apologize this was not clearly stated in the initial proposal. We have now included a table to the project proposal with defined criteria for each sub-study. For your convenience we also provide the table here.

Sub-study	Species	Primary outcome	Go	No-go	Statistical approach
1	Mouse	Transgene-positive cardiomyocytes in combination with upregulation of the target gene or genome correction frequency (relevant methods qPCR, Western Blot, Elisa)	detectable gene and protein	undetectable gene and protein expression	compare gene therapy vs control treated animals directly
2	Mouse	presence of [REDACTED]	≥ 40% reduction in [REDACTED]	< 40% reduction in [REDACTED]	compare PLN-WT and PLN-R14del treated vs control treated animals
3	Mouse	Presence of cardiac fibrosis (determined by histology)	≥ 35% increase in cardiac fibrosis	< 35% increase in cardiac fibrosis	compare PLN-WT vs PLN-R14del with and without additional cardiac stressor
4	Mouse	Improvement of cardiac function [REDACTED]	≥ 40% improvement of cardiac function	< 40% improvement of cardiac function	compare treated vs control treated animals

		volume)			
5	Pig	Functional remodeling of the heart	presence of cardiac arrhythmias and decline in cardiac function	no detectable cardiac arrhythmias and/or decline in cardiac function	sequential analysis to allow proper powering of the study
6	Pig	Transgene-positive cardiomyocytes in combination with upregulation of the target gene or genome correction frequency (relevant methods qPCR, Western Blot, Elisa)	detectable gene and protein	undetectable gene and protein expression	compare gene therapy vs control treated animals directly

Bijlage 1

- Hebt u een chronisch model nodig?

Antwoord: In our project proposal, we highlighted the fact that many carriers of the PLN-R14del mutation remain asymptomatic, and there is limited understanding of the factors that could potentially influence the clinical progression of the disease in individual carriers. As such, we aim to investigate whether external stressors, such as exercise and TAC (transverse aortic constriction), could play a role in the development or exacerbation of the disease. By subjecting PLN-R14del carriers to controlled exercise regimens and TAC procedures, we can monitor and assess any changes in cardiac function and structure. This will help us understand the impact of these external stressors on the disease progression and potentially identify triggers that may contribute to the manifestation of symptoms or the worsening of the condition. Through this investigation, we hope to shed light on the relationship between external stressors and the development of symptoms in PLN-R14del carriers. This knowledge could help identify individuals who may be at higher risk for disease progression. Ultimately, our research aims to contribute to a better understanding of the disease course and provide guidance for clinical decision-making in PLN-R14del carriers.

- Waarom wilt u substudie 3 uitvoeren, terwijl substudie 4 ook preventie onderzoekt?

Antwoord: In sub-study 3 we will investigate the effects of external stressors to induce structural remodeling as we observe in PLN patients (see previous response) and then proceed to sub-study 4.

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

- Bij experimentele procedures, substudie 3: Kunt u beter onderbouwen, waarom de forced exercise treadmill nodig is?

Antwoord: As described in the appendix we observe electrophysiological remodeling, but not substantial and reproducible structural remodeling of the myocardium, suggesting the need for additional cardiac stressors to induce structural pathological remodeling of the heart. New patients presenting with PLN cardiomyopathy already have this structural remodeling present in their heart. Therefore, it is essential to have this structural remodeling featured in our model. Not only to be able to get more insight into the disease development, but more importantly to test for potential treatment for PLN cardiomyopathy. In pilot experiments we have already observed that some degree of structural remodeling is present in the PLN mouse hearts after forced exercise.

- Is het nodig om de modellen a, b, en c parallel aan elkaar te onderzoeken? Zo ja, wilt u beter onderbouwen waarom?

Antwoord: There is no absolute necessity to study the models in parallel. We choose this experimental design to make the project as time efficient as possible. On the other hand, we also understand the wish for a stepwise design in order to limit the use of animals. As such we have now redesigned this experiment into a stepwise approach where we will start with model A (voluntary running wheel) and based on the predefined go/no-go decisions continue to model b and c respectively.

D. Pijn en welzijnsaantasting

Short term: hier ontbreekt de stress door de elektrische shock. Wilt u die toevoegen?

Antwoord: Added

E. Humane eindpunten

- Wilt u een keuze maken?

Antwoord: We choose to use the clinical scoring system as this also includes the criteria for the ECG and open thorax procedures.

F. Classificatie van ongerief

- De DEC is van mening, dat mild = licht ongerief te laag is ingeschat bij 'forced exercise'. Shocks in model 3 geven ernstig ongerief. Het gebruik van tail tickling of air puffs geeft matig ongerief. Wilt u dat aanpassen?

Antwoord: We have now adjusted this to severe discomfort, since we do not know at this point if we will continue using forced exercise, nor do we know how soon we can implement tail tickling or air puffs. As model refinement we aim to adjust the shocks to stimulation by tail tickling or air puffs. As such we expect that the discomfort will be adjusted to moderate along the course of the project

- Het ongerief is ook afhankelijk van de tijdsduur waarin de dieren in de treadmill moeten lopen. Wilt u dat aanpassen?

Antwoord: We have added a sentence just below the procedure list pointing this out.

- Wilt u het intrinsieke ongerief benoemen ten gevolge van de genetische mutatie en het ongerief van het ontwikkelde fenotype?

Antwoord: The mutation itself does not cause any intrinsic discomfort or phenotype in the animals. To observe a phenotype, it is necessary to challenge the mice through specific experimental conditions or stimuli. We have now added this to the procedure list in appendix 1.

	Procedure	Severity
1	Systemic delivery of viral vectors or	Mild
2	Local delivery of gene therapy vectors by open chest injection	Moderate
3	ECG recordings	Mild
4	Echocardiography recordings	Mild
5	Phenotype induction by voluntary running wheel	Mild
6	Phenotype induction by Exercise (forced)	Severe
7	Phenotype induction by TAC surgery	Moderate

- Wilt u beschrijven bij de model-optimalisatie wat de verwachting is in ongerief per type inductie?

Antwoord: This was adjusted in the table provided in F. In addition, adjusting the discomfort for forced exercise has also resulted in a different distribution of discomfort for substudy 3 and 4. This has been adjusted in the table and NTS.

Bijlage 2

- Is er al meer bekend over het fenotype van het varken? Verwacht u een fenotype met licht of matig ongerief? Op welke leeftijd verwacht u een fenotype?

Antwoord: The phenotype of PLN pigs is currently unknown. However, it is reasonable to anticipate that PLN pigs may exhibit early-stage ventricular arrhythmia and progress to heart failure, as observed in human patients with PLN mutations. It is important to note that, similar to findings from the PLN-R14del mouse model, the phenotype in PLN pigs may be relatively mild, requiring external stressors or specific experimental conditions to manifest. The main goals of sub-studies 5 and 6 are indeed to investigate and characterize the unknown phenotype of this new and unique model and to test our therapeutic strategies within the context of a large animal model.

- Hebt u contact met de onderzoeksgroep van het UMC, die ook met deze dieren wil gaan werken?

Antwoord: Yes, we have a broad team all working on complementary projects with the aim to treat and cure different cardiomyopathies. We have regular meetings where we discuss outcomes of our studies and decide on future directions. The project of Mats Vervoorn mostly focuses on treatment performed on the isolated heart model. The overall aim is to study the efficacy of non-viral and viral therapeutics in the ex-vivo perfused heart (ex situ heart perfusion). The PLN pig is included to allow studying efficiency of therapy and on the other hand as proof-of-concept to repair the isolated myocardium in vivo (in vivo heart perfusion). Within this project we aim to characterize the cardiac phenotype of the PLN pig and set-out the first experiments for gene therapy in vivo to allow studying cardiac repair and therapy for PLN cardiomyopathy in a model that is both physiologically and immunologically very similar to the human patient.

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

- In figuur 1 staat gene therapy uitgebeeld in een muis. Kunt u de muis vervangen door een varken?

Antwoord: The picture included for the gene therapy is actually a pig in supine position. We have included text [REDACTED] pig to have this more clear.

B. De dieren

- Hebben de transgene varkens een inherent fenotype of moet het geïnduceerd worden?

Antwoord: We anticipate that like the PLN mice, also in pigs we do not expect an intrinsic phenotype, but it needs to be induced. Upon stimulation we expect to observe electrophysiological changes, similar to what we observe in mice.

C. Huisvesting en verzorging

- Wilt u een keuze maken? *Antwoord: Choice marked.*

F. Classificatie van ongerief

- Wilt u het intrinsieke ongerief benoemen ten gevolge van de genetische mutatie en het ongerief van het ontwikkelde fenotype? Wilt u voor de duidelijkheid een procedure 7 toevoegen als het inherente discomfort van het diermodel (spontaan/ geïnduceerd)?

Antwoord: Since the phenotype of PLN pigs is currently unknown, it is challenging to describe the specific discomfort or symptoms that may be associated with the mutation and resulting phenotype. As described above we anticipate that like the PLN mice, also in pigs we do not expect an intrinsic phenotype. Upon stimulation we expect to observe electrophysiological changes, similar to what we observe in mice. We will have to assess over time if we observe structural remodeling to the heart. If this is not the case, we may need to provide additional cardiac stress, similar to the mouse model, to induce the chronic phenotype of PLN cardiomyopathy. We anticipate the discomfort consequential to the induced phenotype will be mild, however, to prevent underestimation of the discomfort we list it as moderate. This was added to the procedure list under F (Classification of severity of procedures) in appendix 2. In case the animals, contrary to our expectations, show a severe phenotype we will stop the study and get back to the CCD/DEC for new ethical consideration.

- Vlak boven G staat een te laag percentage (7.7%) ernstig. Wilt u dat verbeteren?

Antwoord: Apologies for the typo this has been adjusted.

- Er zijn mogelijkheden, dat u individueel gaat huisvesten. Wilt u dat ongerief ook opnemen?

Antwoord: We try to avoid individual housing as much as possible. We added the following sentence: 'Discomfort related to individual housing, as well as procedural and model related mortality and consequential severe discomfort are taken into account'.

De DEC heeft uw NTS en projectaanvraag op 19 juli 2023 beoordeeld en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen.

Bijlage 1

De onderzoekers zijn in hun antwoorden op vragen over A en F onvoldoende duidelijk geweest:

A. Experimental approach and primary outcome measures.

- Experimental procedures, sub-study 3: Can you provide justification why forced exercise treadmill is necessary?

F. Classification of discomfort

- De DEC's opinion is that mild discomfort is too low for forced exercise. Shocks in model 3 are classified as severe discomfort. The use of tail tickling or air puffs is classified as moderate discomfort.

Antwoord: The discomfort for forced exercise has already been changed to severe based on the earlier comment. This is unchanged in the current version.

- Waarom acht u forced exercise met elektro shock noodzakelijk als stressor?

In uw antwoord gaat u alleen in op het feit dat een dergelijke stressor nodig is, maar niet op de vraag waarom daarvoor ook perse forced exercise nodig is met een bijkomend ernstig ongerief.

Antwoord:

Exercising the mice on a treadmill is considered "forced exercise" because it involves placing the mice on a moving treadmill belt and requiring them to run or walk to stay in place. This is in contrast to voluntary or free-wheel exercise, where mice are provided with a running wheel in their cage, and they can choose when and how much they want to exercise.

The electric grid is part of the treadmill and is applied to encourage animals to keep running or walking on the treadmill. When the animal slows down or stops, a mild shock is delivered, motivating the animal to continue moving. This is done to maintain a consistent exercise intensity. When mice rest on the shock bar for more than 30 seconds during a treadmill exercise, it's generally considered a sign of exhaustion, and we stop the run at that point.

As described in the project proposal and appendix 1 we have experience using a treadmill with electroshock stimulation. In a pilot experiment this type of exercise did result in structural remodeling of the heart in PLN mice. We highlight again the importance for the presence of structural remodeling of the heart in our model to study this disease and being able to treat patients in the future. We do however recognize the additional discomfort for the animals due to forced exercise and electroshock in particular. Therefore, we will first study the effect of voluntary exercise on structural remodeling of the heart. If voluntary exercise result in structural remodeling of the heart, we will continue using voluntary exercise. However, in case, the outcome is negative we will proceed with forced exercise using the treadmill. Given the forced exercise set-up and the experience we currently have we will use this set-up first. We believe this is the best approach to obtain reliable and reproducible results within a reasonable amount of time. This will aid to a reasoned and well-founded decision to continue using a forced exercise set-up. In case we do observe a similar degree of remodeling as we did in the pilot experiments, we will decide to implement forced exercise.

Nonetheless, we are aware that, with continued use, this model requires refinement, and this will be the next first thing we will work on. Together with the technical department we will design the hardware that needs to be added to our set-up to be able to test alternatives (air puffs, tail tickling) for electroshock. We will implement the alternative method that best stimulates mice to exercise. In case, we are not successful in implementing an alternative stimulation method the project will be temporarily stopped and we will contact the IvD/AWB to evaluate the project and discuss the required conditions and ethical consideration for continuation of the project.

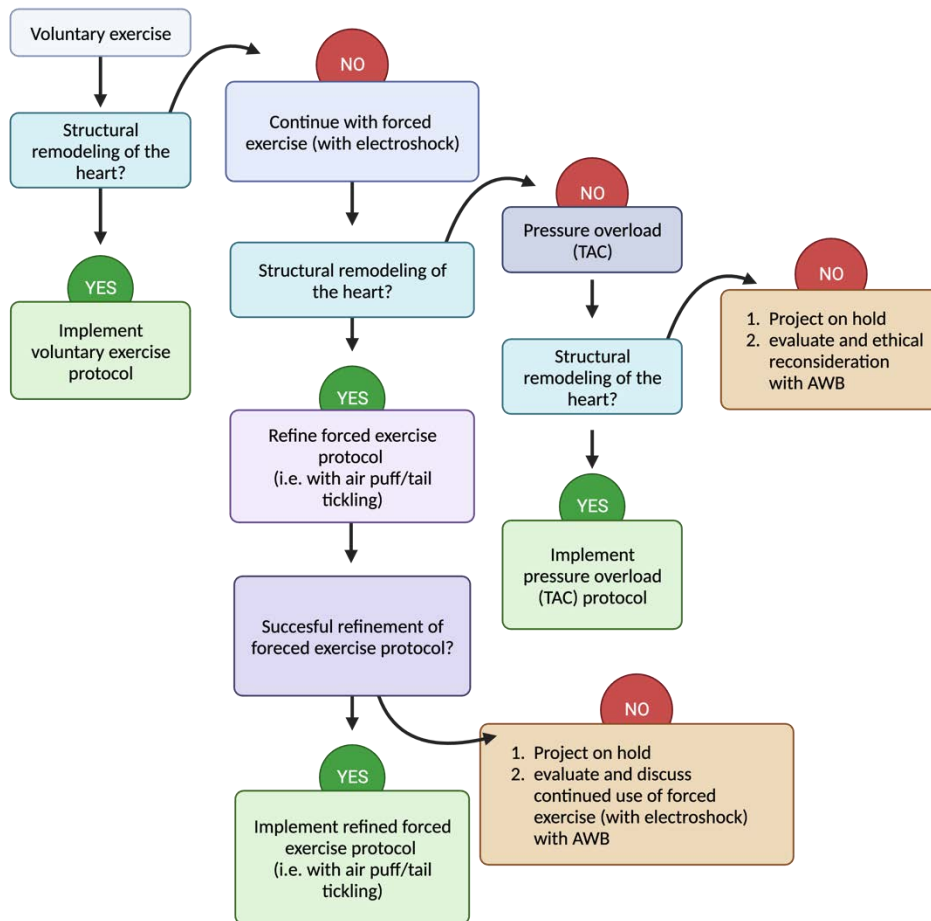
- Hoe wordt besloten of forced exercise gebruikt zal worden al dan niet met shocks of met tail tickling/air puffs?

In het antwoord van F staat: *we do not know at this point if we will continue using forced exercise, nor do we know how soon we can implement tail tickling or air puffs.*

Dit zou aan de voorkant duidelijk moet zijn of er zouden tenminste duidelijke go/no go's moeten zijn op basis waarvan dit besloten wordt en dat het besluit voor de IvD ook navolgbaar is.

Antwoord:

We apologize for not clarifying this better. We have given consideration when to use forced exercise. As described above, we will first study the effect of voluntary exercise on structural remodeling of the heart. If voluntary exercise result in structural remodeling of the heart, we continue the project using voluntary exercise. However, in case, the outcome is negative we will proceed with forced exercise using a treadmill with a shock grid to encourage the mice to keep walking or running. In case we observe a similar degree of remodeling as we did in earlier pilot experiments, we will decide to implement forced exercise. Nonetheless, we are aware that, with continued use, the method to stimulate running can be refined, and this will be the next first thing we will work on. Together with the technical department we will design the hardware that needs to be added to our set-up to be able to test alternatives (air puffs, tail tickling) for electroshock. We will implement the alternative method that best stimulates mice to exercise. In case, we are not successful in implementing an alternative stimulation method the project will be temporarily stopped and we will contact the IVD to evaluate the project and discuss the required conditions and ethical consideration for continued use of forced exercise the project. We have tried to capture this process in a decision tree which is incorporated in appendix 1 and for your convenience provided here below.



- Hoe transleerbaar is de toepassing van de kunstmatige forced exercise of TAC?

Antwoord:

As for every model we use to study disease also this model is not perfect. We have decided on these additional cardiac stressors as they associate with adverse remodeling in patients. For instance, we know that genetic cardiomyopathies often reveal itself during intensive exercise. This implies that cardiac stress is involved in the progression of (genetic) cardiomyopathies. In addition, extreme/intensive exercise has been associated with adverse structural and electrical remodeling in the heart (O'keefe et al. Mayo Clin Proc. 2012, Eijvogels et al. Curr Treat Options Cardiovasc Med. 2018). The TAC model represents increased cardiac afterload, meaning the left ventricle must work harder to eject the blood, resulting in increased stress on the heart. Increased afterload is known to be able to induce pathological cardiac hypertrophy. Indeed, in mice exposed to TAC we observe structural remodeling of the heart and left ventricular dysfunction. Even though the induction of cardiac stress by TAC is artificial we believe the features of cardiac remodeling and dysfunction are well translatable to the human patient.

- Wilt u een extra groep muizen met alleen de TAC interventie toevoegen? Immers kan het effect van de TAC het mogelijke effect van de PLN mutatie overschaduwen.

Antwoord:

We already included a group of WT mice that receive a TAC to be able to distinguish between TAC and the PLN phenotype. The TAC model allows to control for the degree on cardiac remodeling that is

induced. By using a mild constriction model, we will prevent the TAC induced remodeling to overshadow the PLN phenotype we will perform a mild constriction model (25G needle guided constriction). Consequential to this mild constriction less severe cardiac remodeling is induced leaving room for additional remodeling and allowing us to visualize the added phenotype by the PLN mutation.

- Wat is het natuurlijk beloop van de ontwikkeling van hartfalen door de PLN mutatie in de muis?

Antwoord:

As previously mentioned, the humanized PLN-R14del mouse model does not manifest a distinct phenotype in the absence of specific stressors. Notably, we have observed alterations in electrophysiological activity when these stressors are introduced. Furthermore, when conducting cardiac MRI on mice aged three to four months, hPLN-R14del groups displayed changes in ventricular structure. Specifically, there was an increase in the left and right ventricular end-diastolic volumes in the hPLN-R14del mice compared to their hPLN-WT counterparts. To adapt to the resultant heightened wall stress, hPLN-R14del animals exhibited significantly increased stroke volumes following Starling's law of cardiac mechanics. Remarkably, despite the biventricular dilation observed in hPLN-R14del mice, they demonstrated evidence of functional compensation, as indicated by the similarity in left ventricular ejection fraction between hPLN-R14del and hPLN-WT mice (Dave et al., Cardiovascular Res 2022).

Taken together, these findings suggest that the hPLN-R14del mice aged three to four months represent a pre-symptomatic dilated cardiac phenotype characterized by compensated pump function. Subsequent cardiac MRI assessments conducted on mice aged 6, 12, and 18 months did not consistently reveal significant structural remodeling of the heart muscle (unpublished data). This implies that additional cardiac stressors are likely a prerequisite to provoke observable pathological changes in heart structure.

In summary, while electrophysiological remodeling is evident when these mice are subjected to stress conditions, it appears that structural alterations in the heart muscle do not spontaneously develop but may necessitate the introduction of supplementary cardiac stressors to elicit observable pathological remodeling. This underscores the crucial role of external factors and stressors in the study of heart-related conditions in this specific mouse model.

Bijlage 2

De DEC kan geen ethische afweging maken over het gebruiken van een transgeen model als daar niets over bekend is qua fenotype en tijdstippen waarop u een behandeling wilt gaan uitvoeren. De DEC verzoekt u het model eerst te typeren en indien noodzakelijk te fenotyperen. Omdat er nog een onderzoeksgroep van dezelfde vergunninghouder de modellen muis en varken m.b.t. PLN mutatie wil gaan gebruiken adviseert de DEC u te overwegen dit gezamenlijk te doen en daarover contact op te nemen met de IvD.

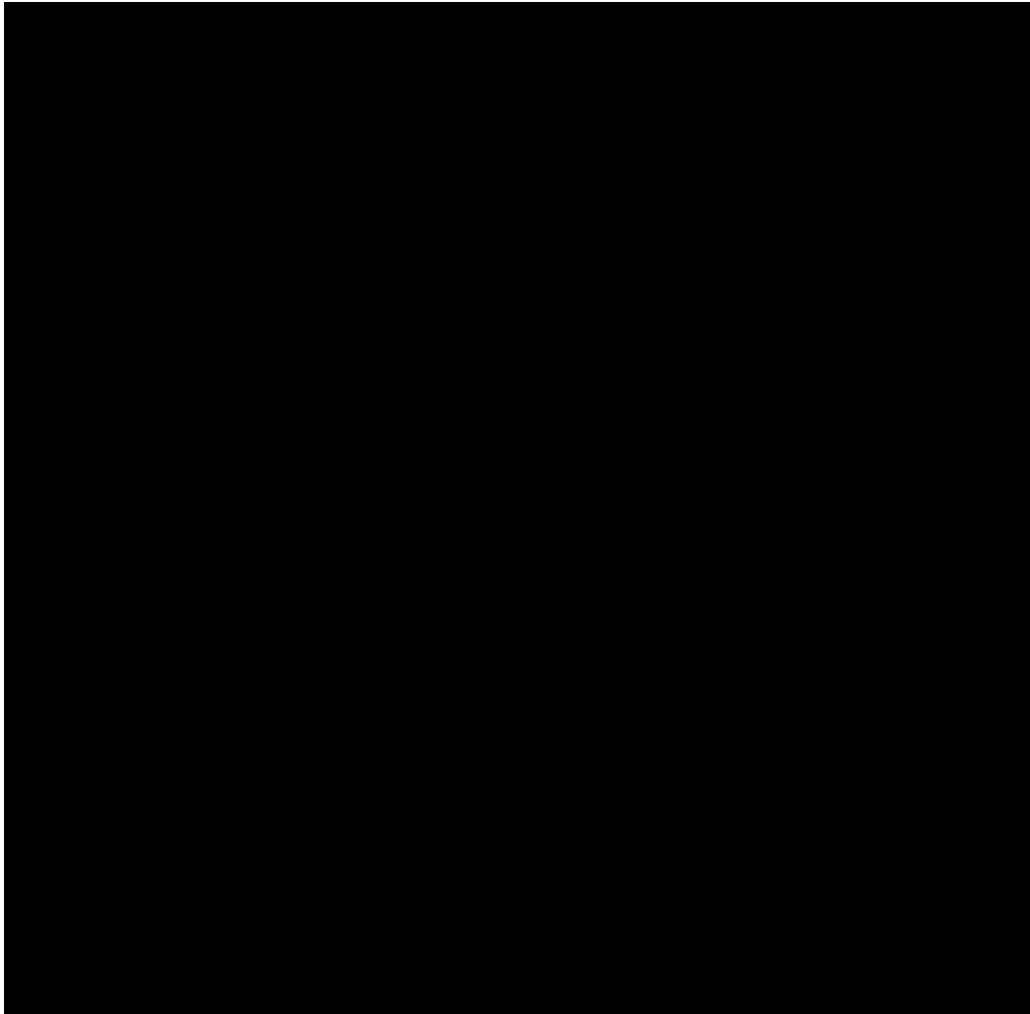
Antwoord:

We apologize for not clarifying this better. The work described in appendix 2 is specifically intended to (pheno)type the transgenic PLN pigs before we continue to use the pigs in our experiments. The PLN

transgenic pigs have been generated as part of a large international research project. We are part of this project as consortium partners and, given our expertise using pigs in cardiovascular research, we will perform the necessary cardiac phenotyping, including ECG and echocardiography, of these pigs in Utrecht. To be crystal clear, we will not be performing any treatment in the PLN transgenic pigs in this project proposal. After phenotyping the pigs, we will request a modification on the current project or write a new project proposal to start intervention studies.

The proof-of-concept gene therapy experiments (substudy 6) that are included in appendix 2 aim to show we can induce transgene expression in pigs. These experiments will be performed in wildtype pigs and not the PLN transgenic pigs. This strategy is also depicted in the figure included in the project proposal and appendix and provided below.

As mentioned in the first rebuttal we have a broad team of experts working on complementary genetic cardiomyopathy projects, including PLN. We have regular meetings where we discuss outcomes of our studies and decide on future directions, so in practice this is already a joint project. However, it is technically not possible to characterize the cardiac phenotype of the PLN pig (functional measurements and histology) as we describe here and use the same heart in the isolated heart model as described in the other project proposal. Nonetheless, it was decided that, until the pigs are properly phenotyped, they will not be used for the project AVD11500202317029



- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud): **het advies is geschreven over de volledig herschreven aanvraag (AVD11500202216225)**

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. *Na herschrijven is de aanvraag nu goed toetsbaar. De onderzoekers willen onderzoeken of humane patiënten met een PLN mutatie behandeld kunnen worden met gentherapie om hiermee de ontwikkeling van cardiomyopathie en daardoor veroorzaakt hartfalen te behandelen of te voorkomen. In Nederland zijn er ca 14.000 dragers met deze aandoening. Daarop volgend is de vraag of deze mutatie dmv gentherapie kan*

repareren. In de herschreven aanvraag is helder in welke stappen het onderzoek zal plaatsvinden met een beslisboom en beslismomenten. Proof of concept of specifieke gentherapie kan helpen de verdere pathogenese te verhinderen zal worden onderzocht in muis modellen waarbij op verschillende manieren een cardiomyopathie wordt opgewekt. Er is inmiddels een varken waarin XXXXXXXXXX is aangebracht. In dat varken zal onderzocht worden of het fenotype voldoende overeenkomsten zal hebben om het effect van gentherapie te kunnen onderzoeken. De DEC heeft o.a. vragen gesteld over de verschillende modellen, de toegevoegde waarde en het ongerief van de tredmolen en elektroshocks, de transleerbare waarde en relatie met andere onderzoekers. Het project is ingebed in een brede samenwerking waardoor voldoende kennis op alle deelgebieden is gewaarborgd.

De aanvraag komt het meest overeen met voorbeeld 1 uit de nieuwe Handreiking "Invulling Definitie Project".

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 *onderzoek naar de gevolgen van PLN mutatie en waarom bepaalde patiënten wel een fenotype ontwikkelen en anderen niet*. Het uiteindelijke doel van het project is *of specifieke gentherapie kan bijdragen in het voorkomen of zelfs genezen van de gevolgen van deze mutatie bij de ontwikkeling van de cardiomyopathie*. De gegevens kunnen ook waardevol zijn voor andere genetisch geïnduceerde ziektes bij de mens. 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 behandelaars en de behoeften vanuit de patiënten met deze mutatie.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn weergegeven in onderstaande tabel

Morele waarden die worden bevorderd:	Welzijn	Autonomie	Rechtvaardigheid
Belanghebbenden			
Onderzoekers		Toename kennis	Reëel belang
Patiënten	Stoppen ontwikkeling fenotype door PLN mutatie	Gezondheid	Reëel belang
Maatschappij		Algemeen belang gezonde samenleving, reductie kosten volksgezondheid	Welzijnsbelang, economisch, geen belang vanuit ethisch perspectief
Fabrikant gentherapie	Kunnen leveren product voor gen therapie	Economisch belang	Geen rechtvaardiging vanuit ethisch perspectief
Morele waarden die in het geding zijn:			

<i>Proefdieren in dit project*</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. *De onderzoekers hebben de infrastructuur en ervaring om het onderzoek uit te voeren langs de translationele as, van geavanceerde in vitro modellen tot kleine en grote diermodellen (van muizenmodellen tot varkensmodellen) en patiëntcohorten. Het multidisciplinaire team van hoofdonderzoekers heeft allemaal jarenlange ervaring in het veld en maakt deel uit van de focusgebieden regeneratieve geneeskunde, circulatoire gezondheid en translationele immunologie van de vergunninghouder. Vooral de diverse expertises in de groep en de nauwe samenwerking met de kliniek, in combinatie met de translationele aanpak maakt het onderzoek uniek in het veld.*

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 opgedeeld in 6 deelvragen die deels parallel en deels sequentieel lopen. Alle genterapiebenaderingen zijn getest op effectiviteit in vitro. Alleen die benaderingen die voldoende, detecteerbare expressie laten zien in vanuit stamcellen ontwikkelde cardiomyocyten zullen in vivo worden toegepast met verschillende toedieningsroutes (systemisch, lokaal cardiaal). Het in vitro onderzoek wordt elders uitgevoerd, maar maakt onderdeel uit van een brede samenwerking. Elke fase is goed uitgelegd en onderbouwd en er zijn heldere beslismomenten met duidelijke criteria tussen de verschillende vervolgstappen. Het in-vivo onderzoek start met de optimalisatie van genterapie bij muizen gevolgd door reparatie en behandeling van vroege, elektrofysiologische remodelering bij PLNR14del-muizen. De laatste fase bestaat uit de karakterisering van het [REDACTED] varkensmodel en de verkenning van mogelijkheden voor genterapie in het varkenshart.*

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 *in principe* gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn. *Indien muizen gaan vechten kunnen ze solitair worden gehuisvest. Ook de varkens worden in principe gehuisvest in groepen volgens de gestelde eisen in de wet, met uitzondering van varkens met een canule of postoperatief tot ze voldoende zijn hersteld van de ingreep.*
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is *na additionele vragen van de DEC* realistisch ingeschat en geclassificeerd. *Van alle modellen is puntsgewijs aangegeven wat de verschillende experimentele handelingen zullen zijn en wat het ingeschatte ongerief zal zijn en het uiteindelijke cumulatieve ongerief. Het ongerief en het % dieren dat een TAC operatie niet overleeft wijkt niet af van gegevens van andere onderzoekers in Nederland. De DEC is tevreden met de verfijning bij het muizenmodel dat geforceerde inspanning pas zal worden toegepast als vrijwillige inspanning mbv tredmolen onvoldoende fenotype van de hartziekte laat zien.*
12. De integriteit van de dieren wordt *fysiek en gedragsmatig aangetast door de vele medisch niet noodzakelijke handelingen, het indien nodig solitair huisvesten en indien dieren niet vrijwillig in de tredmolen willen het gedwongen moeten rennen in de tredmolen (muizen).*
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. *Per diersoort en per model zijn criteria opgenomen die alleen of tezamen met andere criteria aanleiding zullen geven voor euthanasie. Per model wordt hiervoor een klinisch score model gebruikt wat volgens een toelichting van de IvD zeer goed werkt.*

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. *Een groot deel van het (voor)onderzoek wordt met in vitro methoden uitgevoerd op hartspiercellen waarin dezelfde aanpassingen in het PLN-gen aanwezig zijn. Alle potentiële gentherapieën worden eerst op effectiviteit gescreend in vitro. Alleen bij een positieve uitkomst wordt een vervolg onderzoek in vivo gestart. Onderzoekers zijn momenteel nog niet in staat om een volledig hart als organoïde na te maken. Gebruik makend van een afgewezen hart aangeboden voor transplantatie bij de mens, zal het, vooral vanwege de lage aantallen beschikbare donorharten nog vele jaren duren om de onderzoeksvragen te beantwoorden.*
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. *Door gebruik te maken van een op voorhand vastgestelde onderzoeksstrategie met duidelijke beslismomenten, wordt voorkomen dat*

er onnodig proefdieren worden gebruikt. (1). Alle gentherapieën die men wil onderzoeken worden eerst gescreend in gekweekte hartspiercellen. Alleen als een resultaat wordt bereikt, wordt de effectiviteit in vivo onderzocht, eerst in gezonde muizen en vervolgens wordt deze gentherapie gebruikt om aan te tonen dat de behandeling de ontwikkeling van PLN-hartziekte kan voorkomen en/of afremmen. In de laatste fase worden de meest veelbelovende therapieën uit de muismodellen, getest in gezonde varkens om vast te stellen of de therapie het hart bereikt. Na afronding van deze laatste fase kan de gentherapie verder worden ontwikkeld en toegepast worden in het varkensmodel voor PLN-hartziekte. Voordat er besloten wordt door te gaan naar een volgende fase moeten de uitkomsten van de experimenten aan vooraf vastgestelde eisen voldoen. Voor elk experiment wordt met behulp van statistische methoden bepaald hoeveel dieren nodig zijn om een betrouwbare uitspraak over de uitkomsten van het experiment te kunnen doen.

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 gebruikte operatietechnieken worden regelmatig uitgevoerd door ervaren chirurgen die indien nodig worden bijgeschoold om vaardigheid te behouden. Dieren worden zoveel mogelijk in een groep gehuisvest, in kooien aangevuld met verrijking. Dieren worden onder steriele omstandigheden geopereerd en onder anesthesie met perioperatieve pijnbestrijding en na de operatie worden ze gedurende 24 uur in een verwarmde omgeving gehouden om het herstel te bevorderen. Dieren worden intensief gecontroleerd op ongerief. Er zijn vooraf opgestelde humane eindpunten over de maximaal toegestane ongeriefscore. Bij het bereiken van deze score worden dieren uit het experiment gehaald waardoor het optreden van ernstig ongerief zo veel mogelijk wordt voorkomen.*

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Muizen van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet (bijlage 1). Er zullen in bijlage 2 alleen overwegend vrouwelijke dieren gebruikt worden, omdat mannetjes agressiever zijn en zullen gaan vechten. 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 waarschijnlijk vooral met vrouwelijke varkens uit te voeren.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood om na afloop organen uit te kunnen nemen voor verdere analyse. 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.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk *onderzoek naar de gevolgen van PLN mutatie en waarom bepaalde patiënten wel een fenotype ontwikkelen en anderen niet* 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 proefdieren plaats, met voor 216 muizen licht, 1566 muizen matig en 594 muizen ernstig ongerief en voor 48 varkens licht, 84 varkens matig en 24 varkens ernstig ongerief.
Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat *specifieke gentherapie kan bijdragen in het voorkomen of zelfs genezen van de gevolgen van PLN mutatie bij de ontwikkeling van cardiomyopathie. De gegevens kunnen ook waardevol zijn voor andere genetisch geïnduceerde ziektes bij de mens*. 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. De DEC vindt het belangrijk onderzoek omdat het door de toepassing van gentherapie de oorzaak bij de basis zou kunnen aanpakken. De DEC heeft meegewogen dat de aanpak van het onderzoek in verschillende stappen wordt uitgevoerd in een brede onderzoekssamenwerking en dat waar mogelijk in vitro wordt onderzocht en voor het in vivo deel met heldere beslismomenten. De DEC heeft de inschatting van ongerief bijgesteld voor de electrostimulatie en het geforceerd bewegen in de tredmolen, hetgeen door de onderzoeker is overgenomen. De IvD heeft aangegeven daar ook op te zullen toezien. Dat dieren in enkele gevallen solitair moten worden gehuisvest is voldoende onderbouwd voor de DEC. De belangen van industrie/maatschappij met een economische waarde heeft de DEC niet meegewogen in haar afweging.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het *onderzoek naar de gevolgen van PLN mutatie en waarom bepaalde patiënten wel een fenotype ontwikkelen en anderen niet en mogelijke gentherapie van deze mutatie* een essentieel belang vertegenwoordigt en dat dit essentiële belang opweegt tegen de deels beperkte en deels 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. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht



Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie


Aanvraagnummer
AVD11500202216225

Bijlagen

2

Datum 11 juli 2022

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 juli 2022. Het gaat om uw project "New therapeutic strategies to prevent acute injury after myocardial infarction". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD11500202216225. 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

Datum:

11 juli 2022

Aanvraagnummer:

AVD11500202216225

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Experimental cardiology
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 september 2022
Geplande einddatum: 31 augustus 2027
Titel project: New therapeutic strategies to prevent acute injury after myocardial infarction
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe behandeling het verminderen van schade aan het hart na een hartinfarct
Naam DEC: DEC-Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.757,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: Pro. dr. A.W. Hoes
Functie: Decaan/Vice voorzitter rvb UMC Utrecht
Plaats: Utrecht
Datum: 1 juli 2022

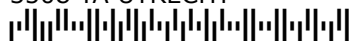


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

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
AVD11500202216225

Bijlagen

2

Datum 11 juli 2022

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 11 juli 2022

Vervaldatum: 10 augustus 2022

Factuurnummer: 2216225

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD11500202216225	€ 1.757,00

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] [nl: DEC-Utrecht@umcutrecht.nl](mailto:DEC-Utrecht@umcutrecht.nl)
Subject: Aanhouden AVD11500202216225
Date: donderdag 28 september 2023 17:40:05

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 08-07-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Gene therapy for PLN-R14del-induced cardiomyopathy." met aanvraagnummer AVD11500202216225. 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 uw NTS onder 'Expected impacts/adverse effects on the animals' en 'Refinement' spreekt u over het uit het experiment halen van de dieren. Kunt u in uw NTS verduidelijken wat u hiermee bedoelt?

Kunt u in uw NTS benoemen dat de dieren individueel gehuisvest kunnen worden?

In uw NTS noemt u onder 'In what procedures will the animals typically be used' dat u de dieren laat rennen. Kunt u hier de verschillende methoden (vrijwillig/niet vrijwillig met bijbehorende stimulans) benoemen die u kunt toepassen?

In de NTS onder 'Expected impacts/adverse effects on the animals' noemt u dat u regels hebt opgesteld om ernstig ongerief bij de dieren te voorkomen. Dit lijkt tegenstrijdig omdat u noemt dat dieren ernstig ongerief zullen ondergaan. Kunt u dit verduidelijken?

Kunt u daarnaast ook in uw NTS verduidelijken waarom ernstig ongerief noodzakelijk is?

U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

Onduidelijkheden

De titels van de bijlagen dierproeven komen niet overeen met de titels van de bijlagen genoemd in de tabel onder 3.4.3 van het projectvoorstel. Kunt u deze in met elkaar overeenstemming brengen?

In bijlagen 3.4.3.1 en 3.4.3.2 noemt u onder 'E. Humane endpoints' dat dieren met een bepaalde score zullen worden behandeld of gedood. Kunt u hier ingaan op welke score dat zal zijn en hoe deze score tot stand komt?

Kunt u daarnaast ook aangeven hoe de individuele parameters voor humane eindpunten worden gescoord?

Doorgaans wordt verwacht dat bij het TAC model in muizen ernstig ongerief niet kan

worden uitgesloten. Kunt u in bijlage 3.4.3.1 aangeven hoe u voorkomt dat het TAC model in uw project niet meer dan matig ongerief zal ervaren?

Daarnaast noemt u in de tekst onder 'F. Classification of severity of procedures' dat zowel de 'forced exercise' muizen als TAC model muizen matig ongerief zullen ondervinden. Dit komt niet overeen met de eerste tabel onder F. waarin u aangeeft dat 'forced exercise' ernstig ongerief veroorzaakt. Kunt u dit in overeenstemming brengen?

In bijlage 3.4.3.1 onder 'F. Classification of severity of procedures' ontbreekt het ongerief dat dieren zullen ervaren wanneer zij solitair zullen worden gehuisvest. Kunt u dit benoemen en meenemen in de (cumulatieve) ongeriefinschatting?

In communicatie met de DEC noemt u dat het fenotype bij de varkens beschreven in bijlage 3.4.3.2 geïnduceerd zal worden. Kunt u aangeven of het induceren van het fenotype een handeling zal zijn die u zult toepassen? Zo ja, kunt u deze handeling beschrijven in de bijlage dierproeven onder 'A. Experimental approach and primary outcome parameters'?

De door u gewenste startdatum ligt in het verleden. Mocht u de gewenste start- en einddatum willen herzien, kunt u dit doen door een nieuw, ondertekend aanvraagformulier met aangepaste start- en einddatum in te dienen.

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.

Mochten uw antwoorden voor vrijdag 6 oktober a.s. door ons ontvangen zijn, kunnen deze worden meegenomen tijdens de inhoudelijke bespreking van uw dossier in de vergadering van de CCD.

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.

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag

Datum 5 oktober 2023
Betreft Aanhouden AVD11500202216225

Divisie Hart en Longen

**Cardiologie/Laboratorium
voor Experimentele
Cardiologie**

Geachte CCD,

Dank voor uw bericht en het onder onze aandacht brengen van enkele onduidelijkheden in onze aanvraag. Onderstaand treft u onze reactie op uw punten. Veranderingen in het projectvoorstel en/of bijlagen zijn zichtbaar als blauwe tekst.

Hopende u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Hoogachtend,



Associate professor

Bezoekadres:
Heidelberglaan 100
3584 CX Utrecht

Postadres:
Huispostnummer Huispostnr.
Kamernummer Kamernr.
Postbus 85500
3508 GA Utrecht

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

In uw NTS onder 'Expected impacts/adverse effects on the animals' en 'Refinement' spreekt u over het uit het experiment halen van de dieren. Kunt u in uw NTS verduidelijken wat u hiermee bedoelt?

Dit is aangepast naar: Er wordt dagelijks gekeken hoe het met de dieren gaat en we hebben duidelijke regels opgesteld voor wanneer een dier gedood wordt om onnodig lijden te voorkomen

Kunt u in uw NTS benoemen dat de dieren individueel gehuisvest kunnen worden?

Toegevoegd onder expected impacts/adverse effects on the animals: Bij uitzondering zullen dieren alleen in een kooi geplaatst moeten worden. Dit kan bij muizen bijvoorbeeld als gevolg van vechtgedrag zijn. Omdat muizen groepsdieren zijn vinden ze het minder prettig om alleen in een kooi te zitten en dit zal invloed hebben op het welzijn van het dier.

In uw NTS noemt u onder 'In what procedures will the animals typically be used' dat u de dieren laat rennen. Kunt u hier de verschillende methoden (vrijwillig/niet vrijwillig met bijbehorende stimulans) benoemen die u kunt toepassen?

Ingevoegd als: Dit doen we door de dieren te laten rennen (vrijwillig of niet vrijwillig waarbij het dier wordt hierbij tot rennen aangezet door een elektrische schok) of door middel van een operatietechniek waarbij we de grote lichaamslagader vernauwen (drukoverbelasting).

In de NTS onder 'Expected impacts/adverse effects on the animals' noemt u dat u regels hebt opgesteld om ernstig ongerief bij de dieren te voorkomen. Dit lijkt tegenstrijdig omdat u noemt dat dieren ernstig ongerief zullen ondergaan. Kunt u dit verduidelijken?

Excuses voor de onduidelijke beschrijving. We proberen te voorkomen dat de dieren onnodig lijden. Dit is nu ook zo aangepast in de NTS.

Kunt u daarnaast ook in uw NTS verduidelijken waarom ernstig ongerief noodzakelijk is?

Aangepast in expected impacts/adverse effects on the animals: Doordat het hart steeds een beetje slechter wordt en daardoor het hartfalen steeds erger krijgen dieren hiervan ernstig ongerief. Helaas is dit noodzakelijk om het ziektebeeld hartfalen goed te kunnen bestuderen.

U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

Excuses, de NTS is overgezet naar Excel en als zodanig ingediend.

Onduidelijkheden

De titels van de bijlagen dierproeven komen niet overeen met de titels van de bijlagen genoemd in de tabel onder 3.4.3 van het projectvoorstel. Kunt u deze in met elkaar overeenstemming brengen?

Excuses hiervoor, dit is aangepast

In bijlagen 3.4.3.1 en 3.4.3.2 noemt u onder 'E. Humane endpoints' dat dieren met een bepaalde score zullen worden behandeld of gedood. Kunt u hier ingaan op welke score dat zal zijn en hoe

deze score tot stand komt?

Kunt u daarnaast ook aangeven hoe de individuele parameters voor humane eindpunten worden gescoord?

De klinische fenotypes van hartfalen, zoals kortademigheid en vocht retentie, zijn bij muizen vaak niet, of slecht zeer beperkt, zichtbaar. Om die reden hebben we surrogaatmarkers voor klinische symptomen van hartfalen gedefinieerd welke, met behulp van een klinisch scoreblad, gescoord kunnen worden. De klinische scores worden onderverdeeld in gedrag (mobiliteit, verzorging en ademhaling), inspectie van de operatiewond en het lichaamsgewicht van het dier. Voor elke van deze onderdelen wordt ingeschaald in welke mate dit aanwezig is (normaal, matig veranderd, ernstig veranderd). Hieronder is de score voor de verschillende paramaters weergegeven. Indien de totale score (gecombineerde score van klinische symptomen + wondinspectie + gewicht) groter is dan 2 wordt contact opgenomen met de IVD en dierenarts voor overleg. Bij een score van 3 of hoger is het humane eindpunt bereikt.

Klinische symptomen Score:

1. Gedrag:

a. Mobiliteit

0 = Normaal

1 = matig veranderd

2 = ernstig veranderd

b. Verzorging

0 = Normaal

1 = matig veranderd

2 = ernstig veranderd

c. Ademhaling

0 = Normaal

1 = matig veranderd

2 = ernstig veranderd

2. Wond inspectie

a. 0 = Normaal

b. 1 = Matig veranderd en behandelbaar

c. 3 = Ernstig veranderd en niet behandelbaar

3. Gewicht

a. 0 = Normaal

b. 1 = Matig veranderd

c. 3 = Ernstig veranderd en/of matig veranderd en niet herstellend

Doorgaans wordt verwacht dat bij het TAC model in muizen ernstig ongerief niet kan worden uitgesloten. Kunt u in bijlage 3.4.3.1 aangeven hoe u voorkomt dat het TAC model in uw project niet meer dan matig ongerief zal ervaren?

De mate van ongerief is direct afgeleid van de methode van chirurgie en de mate van hartfalen ontwikkeling in dit model. We maken gebruik van een minimaal invasieve operatietechniek waarbij een kleine opening gemaakt wordt tussen de ribben en de borstkas verder intact blijft. Er worden hier dus geen ribben doorgeknipt om de borstkas te openen. Daarnaast kiezen we in dit

projectvoorstel voor een mildere vernauwing van de aorta, waardoor de ontwikkeling van hartfalen verminderd is in deze dieren. We kiezen hiervoor om het eventueel toegevoegde effect van de PLN-mutatie zichtbaar te kunnen maken. De combinatie van een minimaal invasieve operatietechniek en een minder ernstige hartfalen ontwikkeling leidt, naar onze inzichten, tot matig ongerief. De DEC commissie heeft geen bezwaar gemaakt tegen deze inschaling.

Daarnaast noemt u in de tekst onder 'F. Classification of severity of procedures' dat zowel de 'forced exercise' muizen als TAC model muizen matig ongerief zullen ondervinden. Dit komt niet overeen met de eerste tabel onder F. waarin u aangeeft dat 'forced exercise' ernstig ongerief veroorzaakt. Kunt u dit in overeenstemming brengen?

Excuses hiervoor, dit is aangepast

In bijlage 3.4.3.1 onder 'F. Classification of severity of procedures' ontbreekt het ongerief dat dieren zullen ervaren wanneer zij solitair zullen worden gehuisvest. Kunt u dit benoemen en meenemen in de (cumulatieve) ongeriefinschatting?

Dit is toegevoegd aan de tabel met een voetnoot dat individuele huisvesting alleen bij uitzondering plaatsvindt en dat er, voorafgaand aan de potentiële individuele huisvesting, altijd overleg met de IVD plaatsvindt. Omdat individuele huisvesting alleen bij uitzondering plaatsvindt is dit niet meegenomen in de cumulatieve ongerief inschaling.

In communicatie met de DEC noemt u dat het fenotype bij de varkens beschreven in bijlage 3.4.3.2 geïnduceerd zal worden. Kunt u aangeven of het induceren van het fenotype een handeling zal zijn die u zult toepassen? Zo ja, kunt u deze handeling beschrijven in de bijlage dierproeven onder 'A. Experimental approach and primary outcome parameters'?

Excuses als dit niet duidelijk genoeg verwoord is, maar in de huidige aanvraag zullen we geen handelingen doen om het fenotype te induceren. We bestuderen alleen of het fenotype zich spontaan ontwikkelt in de ████████ varkens. Indien het nodig blijkt dat het fenotype geïnduceerd moet worden zal er een addendum op de huidige aanvraag of een nieuw projectvoorstel ingediend worden bij de CCD.

De door u gewenste startdatum ligt in het verleden. Mocht u de gewenste start- en einddatum willen herzien, kunt u dit doen door een nieuw, ondertekend aanvraagformulier met aangepaste start- en einddatum in te dienen.

De gewenste startdatum is in het formulier 'aanvraag projectvergunning' gewijzigd naar 16-Oktober 2023



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD11500202216225

Bijlagen

3

Datum 23 oktober 2023

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 8 juli 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Gene therapy for PLN-R14del-induced cardiomyopathy." met aanvraagnummer AVD11500202216225. 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 17 oktober 2023 tot en met 15 oktober 2027.

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 juli 2028 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:

23 oktober 2023

Aanvraagnummer:

AVD11500202216225

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 25 september 2023. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 8 november 2022 en 28 september 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op eufemistisch taalgebruik, het benoemen van individuele huisvesting van de dieren, het uitschrijven van individuele handelingen bij de dieren en het onderbouwen van ernstig ongerief in de NTS, de titels van de bijlagen dierproeven in het projectvoorstel, de toegepaste scores bij de humane eindpunten, het ongerief van individueel huisvesten, het gebruikte TAC model en 'forced exercise' in muizen in bijlage 3.4.3.1 en de toegepaste scores bij en invulling van de humane eindpunten en het ongerief bij het verwachte fenotype bij varkens in bijlage 3.4.3.2. 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 juli 2028 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.

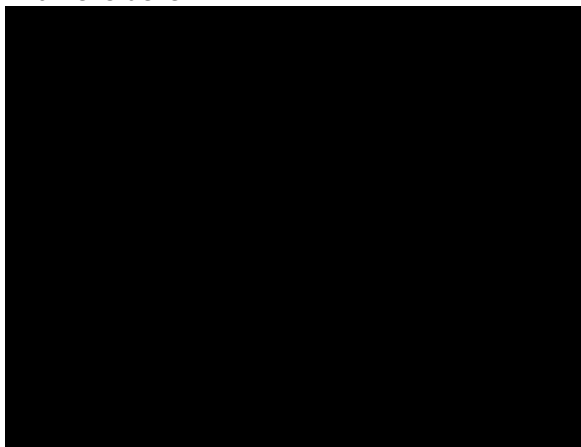
Datum:
23 oktober 2023
Aanvraagnummer:
AVD11500202216225

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.

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: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 oktober 2023 tot en met 15 oktober 2027, voor het project "Gene therapy for PLN-R14del-induced cardiomyopathy." met aanvraagnummer AVD11500202216225, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is

██████████ Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 8 juli 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 16 oktober 2023;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Gene therapy approaches for PLN-R14del induced cardiomyopathy in mice, zoals ontvangen op 16 oktober 2023;
 - 3.4.3.2 Gene therapy approaches for PLN-██████████-induced cardiomyopathy in pigs, zoals ontvangen op 16 oktober 2023;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 16 oktober 2023;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 25 september 2023
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 16 juni 2023, 16 oktober 2023.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Gene therapy approaches for PLN-R14del induced cardiomyopathy in mice			
	Muizen (Mus musculus) / C57BL/6J, PLN/R14del, PLN/WT	2.376	25,0% Ernstig 65,9% Matig 9,1% Licht
3.4.3.2 Gene therapy approaches for PLN-R14del-induced cardiomyopathy in pigs			
	Varkens (Sus scrofa domesticus) ██████████ Landrace pig	156	15,4% Ernstig 53,9% Matig 30,8% Licht

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de

Aanvraagnummer: AVD11500202216225

wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2028 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.
- 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:
AVD11500202216225

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:
AVD11500202216225

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.