

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

| | |
|--|---|
| Naam van het project | Gentherapie voor de behandeling van ernstige hartritmestoornissen |
| NTS-identificatiecode | NTS-NL-026167 v.1, 12-04-2023 |
| Land | Nederland |
| Taal | nl |
| Duur van het project, uitgedrukt in maanden. | 60 |
| Trefwoorden | hartziekte hartritme gentherapie toediening virale vectoren |
| 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). | Het hoofddoel van het project is nieuwe behandelingen te vinden voor ziekten van het hart die verband houden met het hartritme. Wij willen manieren vinden om harten te behandelen door gebruik te maken van genen die gespecialiseerde structuren van specifieke cellen in het hart, die verantwoordelijk zijn voor een gezond hartritme, kunnen herstellen. Eerst zullen we deze genen vinden met behulp van methoden waarbij geen dierproeven nodig zijn. Vervolgens zullen we aantonen dat het mogelijk is de genen op de juiste plaats te brengen in het hart van een varken, dat qua grootte en functie vergelijkbaar is met het menselijk hart. Tenslotte zullen we de genen die het hartritme kunnen herstellen met de juiste methoden voor toediening gebruiken in een varken met een hartritmestoornis, om te zien of we een gunstig effect kunnen vaststellen. Het is belangrijk om nieuwe behandelingen voor hartritmestoornissen te vinden, want momenteel kunnen veel van deze ziekten, vooral als zij zeer ernstig zijn, alleen worden behandeld met een elektronische pacemaker, die moet worden geïmplanteerd en kan leiden tot negatieve bijwerkingen, zoals infecties wanneer de batterij moet worden vervangen. Ook reageren deze elektronische pacemakers niet zoals een gezond hart zou doen op stress of uitputting. Dit alles kan op lange termijn leiden tot een ernstige verzwakking van het hart. Als we succes hebben met onze strategie om hartritmestoornissen met genen te behandelen, hopen we dat het hart wordt hersteld en weer functioneert zoals voor de ziekte. |
| 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). | De voordelen die wij van dit project verwachten zijn tweeledig. Eerst en vooral hopen we betere behandelingen te vinden voor wijdverspreide hartziekten die de kwaliteit en de duur van het leven van patiënten ernstig aantasten. Als we een manier vinden om hartritmestoornissen met genen te behandelen, zal de behandelingsprocedure relatief eenvoudig zijn, door een oplossing (met daarin de genen) in het hart te injecteren, met behulp van een katheter of tijdens een hartoperatie. Het effect van deze behandeling is hopelijk een genezing van de ziekte, waardoor het implanteren van elektronische pacemakers en het voortdurend gebruik daarvan bij patiënten overbodig wordt. Het vinden van een nieuwe en genezende behandeling voor deze grote patiëntengroep zal ook een gunstig effect hebben op de samenleving, doordat de economische lasten voor de gezondheidszorg worden verminderd en de gevolgen voor de algemene productiviteit en arbeid worden vermeden. Ten tweede kan ons project bijdragen aan het verbeteren van gentherapie voor andere ziekten. Wij hopen aan te tonen dat specifieke combinaties van genen en vectoren, dat wil zeggen structuren die deze genen dragen en overbrengen, en die gemaakt kunnen worden van natuurlijk voorkomende, maar ongevaarlijke virussen of van speciaal ontworpen kunstmatige verbindingen, doeltreffend kunnen werken om een specifieke ziekte in een specifiek orgaan te behandelen. Hetzelfde principe, waarbij eerst genen worden gevonden en de toediening wordt getest en vervolgens beide worden gecombineerd om tot een nieuwe therapie te komen, zou kunnen worden gebruikt voor ziekten in andere organen met behulp van andere genen, vectoren en toedieningsroutes. Dit heeft het potentieel om een zeer belangrijke verandering teweeg te brengen in de gezondheidszorg, vooral |

voor ziekten die momenteel niet of alleen symptomatisch kunnen worden behandeld, wat betekent dat niet de oorzaak van de ziekte, maar alleen de symptomen ervan worden behandeld.

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>In een typisch experiment worden de dieren (varkens) eerst in een toestand gebracht die lijkt op die van een menselijke patiënt met een hartritmestoornis. Tijdens de eerste interventie wordt het dier verdoofd en wordt een katheter via een ader in de lies in een hartkamer ingebracht. Vervolgens wordt een specifieke plek van het hartgeleidingssysteem beschadigd met een kleine en zeer plaatselijke energie-impuls, zoals van een magnetron, met hartritmestoornissen als gevolg. Om het dier in leven te houden is vóór deze procedure een elektronische pacemaker geïmplantéerd, die ook bij mensen kan worden gebruikt. Ook is een speciale telemetriesonde onder de huid van het dier geïmplantéerd om de hartslagen en de activiteit van het dier te kunnen meten zonder het dier aan te raken of te storen. Na enkele weken, waarin de dieren worden gecontroleerd op hun gezondheidstoestand en welzijn en zo nodig met medicijnen worden behandeld, worden ze tijdens de tweede interventie opnieuw verdoofd om de genterapiebehandeling toe te dienen. Hiervoor zijn verschillende toedieningsroutes mogelijk, die zullen worden getest. Dit kan met een eenvoudige injectie in een ader of er wordt opnieuw een katheter ingebracht om de genterapie van binnenuit het hart te injecteren. Het kan ook nodig zijn om de borstkas te openen om toegang tot het hart te krijgen om de genterapie aan te brengen. Om de functie van het hart te kunnen beoordelen worden tijdens de beschreven procedures methoden gebruikt waarmee het hart in beeld kan worden gebracht, zoals echocardiografie en MRI. Deze beeldvormingstechnieken vereisen ook verdoving van het dier, maar de huid van het dier hoeft niet te worden gesneden. Aangezien bekend is dat voor sommige vectoren het immuunsysteem van het dier zal reageren, met ongewenste neveneffecten, zullen wij immunosuppressie toepassen. Immunosuppressie betekent dat het eigen afweersysteem van het dier gedeeltelijk wordt geïnactiveerd door het gebruik van specifieke medicijnen. Deze medicatie zal worden toegediend door vermenging met voedsel of door injectie via een vaste katheter, die ook kan dienen als permanent toegangspunt voor medicatie en bloedafname. Deze katheter maakt het noodzakelijk om de dieren individueel te houden. Na een observatieperiode van 1-6 weken na toediening van de genterapie wordt het dier tijdens de derde interventie opnieuw verdoofd en wordt de hartfunctie gecontroleerd, hierna wordt het dier gedood en wordt het hart geanalyseerd.</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>De dieren kunnen stress ondervinden door het ontwaken en herstellen van de verdoving en anesthesie. Tussen de afzonderlijke verdovingen moet een herstelperiode van ten minste een week liggen en in de loop van een experiment van 10 weken mogen niet meer dan 5 verdovingen/anesthesieën plaatsvinden. Bovendien kunnen de dieren door de geïntroduceerde hartritmestoornis last krijgen van beginnende hartaandoeningen. Dit kan blijken uit ademhalingsmoeilijkheden en verminderde algemene activiteit en kan tot 4 weken duren. Ook ongewenste en onverwachte bijwerkingen van immunosuppressie kunnen vermoeidheid en koorts zijn. Aangezien de dieren nauwlettend worden gevolgd, zullen wij de immunosuppressie-medicatie tijdig wijzigen, zodat dit leed niet langer dan maximaal een week duurt. Er kunnen ook ontstekingsreacties optreden als gevolg van de toediening van de genterapievector, bijvoorbeeld gezwollen gewrichten. Dit is echter onverwacht en mag niet langer dan enkele (max. drie) dagen duren. Tenslotte kunnen als gevolg van operaties, wonden of injectieplaatsen roodheid en infecties optreden. Deze moeten snel kunnen worden behandeld, zodat het ongemak niet langer dan enkele (2-3) dagen duurt.</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>Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)</td> <td>504</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>150</td> <td>354</td> </tr> </tbody> </table> | Soort: | Totaal aantal | Geraamde aantallen naar ernstgraad | | | | Terminaal | Licht | Matig | Ernstig | Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>) | 504 | 0 | 0 | 150 | 354 |
| Soort: | Totaal aantal | | | Geraamde aantallen naar ernstgraad | | | | | | | | | | | | | |
| | | Terminaal | Licht | Matig | Ernstig | | | | | | | | | | | | |
| Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>) | 504 | 0 | 0 | 150 | 354 | | | | | | | | | | | | |
| <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</p> | <p>De dieren worden aan het eind van de experimenten gedood. Wij moeten toegang hebben tot vitale organen van het dier, met name het hart, om de effecten van de uitgevoerde genterapiebenadering</p> | | | | | | | | | | | | | | | | |

de procedure.

te kunnen begrijpen. Het hart zal worden gebruikt voor de analyse van de weefselstructuur en de genactiviteit.

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.

Wij voeren zoveel mogelijk werk uit zonder dieren, zoals het testen van de functie van de genterapievectoren in cellen. Bovendien voeren wij studies uit met behulp van computerprogramma's om te proberen betere genen te ontwerpen voor het beoogde doel. Maar ondanks de vooruitgang van deze modellen kunnen zij onze behoefte aan dierproeven momenteel niet volledig vervangen. Dit houdt verband met de complexiteit van het gehele levende organisme, waarin verschillende celtypes een belangrijke rol spelen bij de regulering van het hartritme. Hun interacties en ook de interacties tussen verschillende organen dragen bij tot het functioneren en disfunctioneren van het hartritme. Daarom blijven dierproeven essentieel om onze onderzoeksdoelen te bereiken.

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.

Wij zullen eerst genen vinden met de juiste functies voor de therapie van hartritmestoornissen zonder gebruik te maken van proefdieren. Dit zal ons in staat stellen het aantal dieren in experimentele groepen te beperken door vooraf de beste combinaties van genen en vectoren te selecteren. Wij zullen er voortdurend naar streven het aantal experimentele groepen verder te beperken of het aantal dieren per groep te verminderen (bijvoorbeeld door meerdere monsters van één dier te verzamelen en zo mogelijk controlegroepen te combineren) en zullen rekening houden met aanvullende informatie uit onze of gepubliceerde studies, zodra die beschikbaar is.

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.

Voor elke procedure zal het varken zo kort mogelijk uit de stal worden gehaald om ervoor te zorgen dat ongemak en stress bij het hanteren en de experimentele procedures tot een minimum worden beperkt. Waar mogelijk zal gebruik worden gemaakt van procedures waarbij weinig of niet in de huid wordt gesneden. De mensen die de procedures uitvoeren zijn zeer ervaren en zullen de procedures op een zeer deskundige en gecontroleerde manier uitvoeren. De dieren krijgen pijnstilling voor, tijdens en na de procedures. Bovendien worden ze in groepen gehouden en krijgen ze extra voorwerpen om te spelen en ze bezig te houden. Ook worden de dieren regelmatig geobserveerd om eventuele ongemakken te evalueren. Wanneer we tekenen van verzwakking of te veel ongerief vaststellen, worden de dieren uit de experimenten gehaald en gedood om het lijden te stoppen. Dit zal gebeuren op een manier die vooraf is beschreven.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

Wij zullen varkens gebruiken omdat hun hart qua grootte en functie vergelijkbaar is met het menselijk hart. Dit geldt ook voor hun immuunsysteem en metabolisme. Wij zullen jonge varkens gebruiken om ervoor te zorgen dat het hart groot genoeg is om vergelijkbaar te zijn met het menselijke hart (>300 g), terwijl de dieren toch hanteerbaar blijven qua grootte en gewicht (<100 kg).

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

| | |
|--|------------|
| Project geselecteerd voor BA? | ja |
| Termijn voor BA | 14-02-2029 |
| Reden voor de beoordeling achteraf | |
| Bevat ernstige procedures | ja |
| Maakt gebruik van niet-menselijke primaten | |
| Andere reden | |
| Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf | |

AANVULLENDE VELDEN

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres
Bolognalaan 50
3584 CJ Utrecht

postadres
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

T (030) 253 15 69
info@ivd-utrecht.nl
www.ivd-utrecht.nl

uw kenmerk
ons kenmerk

IvD-230724-144629

datum
onderwerp

24 juli 2023

Overdracht projectvergunning van AMC naar UMC Utrecht

Beste medewerkers van het ondersteunend bureau van de CCD,

Hierbij doe ik u een korte verklaring toekomen, die is ondertekend door de instellingvergunninghouders van het AMC Amsterdam en het UMC Utrecht. Daarin verklaren zij, dat de projectvergunning voor het project "Investigation and development of gene therapy for AV block using porcine models" (AVD11800202316683) met wederzijdse instemming wordt overgedragen van het AMC naar het UMC Utrecht.

Binnen het AMC was de Verantwoordelijke onderzoeker [REDACTED] bij het Amsterdam UMC. Na de overdracht wordt de nieuwe verantwoordelijke onderzoeker [REDACTED] bij het UMC Utrecht.

De IvD Utrecht verklaart hierbij, dat er binnen de instelling passende faciliteiten en gekwalificeerd personeel aanwezig zijn, waardoor het mogelijk is om de voorziene experimenten binnen de gestelde wettelijke voorwaarden uit te voeren. De IvD Utrecht zal het toezicht op dit project uitoefenen.

Met vriendelijke groet


[REDACTED]


Utrecht, 21st July 2023

To whom it may concern,

This letter serves as a formal accordance between the Academic Medical Center (Meibergdreef 9, 1105AZ Amsterdam, The Netherlands) and University Medical Center Utrecht (Heidelberglaan 100, 3584CX Utrecht, The Netherlands) whereby Mw. drs. M.L. Köhlen (current license holder) from Academic Medical Center concurs with the transference of the CCD license titled "Investigation and development of gene therapy for AV block using porcine models" with number AVD11800202316683 to Prof. Dr. Arno Hoes (future license holder) from University Medical Center Utrecht.

In conformity to the abovementioned statement, both parties hereby sign the present document.


Academic Medical Center
Date: July 21, 2023


University Medical Center Utrecht
Date: *July 21, 2023*

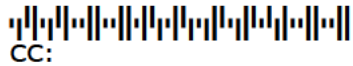


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 22600

1100 DD AMSTERDAM



CC:

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD11500202316683-1

Datum 11 augustus 2023

Betreft Beslissing omzetten vergunning projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 24 juli 2023 hebben wij een melding ontvangen met het verzoek voor het overzetten van een vergunning. Het gaat om het project "Translatable gene therapy approaches to treat complete AV block", waarvoor op 04 april 2023 een vergunning is afgegeven. De melding is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD11500202316683-1. Wij hebben uw verzoek behandeld en hebben als volgt beslist.

Beslissing

Hierbij besluiten wij dat hieronder genoemde vergunning voor het tijdvak 03 april 2023 tot en met 14 februari 2028 wordt overgezet naar UMC Utrecht, wat betekent dat UMC Utrecht vanaf heden vergunninghouder is. De verandering die plaatsvindt, betreft een aanpassing van het aanvraagnummer, in die zin dat het deelnemernummer van 11800 wordt gewijzigd in het deelnemernummer van 11500. De vergunning blijft voor het overige ongewijzigd. De grondslag voor dit besluit is gelegen in artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Getoetst is of de instelling voor de hierna genoemde vergunning voldoet aan de in de wet gestelde eisen, zoals die zijn geformuleerd onder het kopje 'procedure'. Het verzoek betreft de volgende vergunning:

| <u>Oude vergunning</u> | <u>Nieuwe vergunning</u> |
|------------------------|--------------------------|
| AVD1180002316683 | AVD11500202316683 |

Procedure

Naar aanleiding van uw verzoek zijn wij nagegaan of aan de randvoorwaarden voor het overzetten van de vergunning is voldaan.

U heeft het volgende verklaard:

- 1 U bent in het bezit van een instellingsvergunning;
- 2 Voor de uitvoering van de projecten zijn de benodigde faciliteiten aanwezig;
- 3 Voor de uitvoering van de projecten is gekwalificeerd personeel aanwezig;
- 4 Er is een Instantie voor Dierenwelzijn aanwezig, die toezicht houdt op de uitvoering;
- 5 Er is inzicht gegeven of uitvoerende onderzoekers meegaan naar de nieuwe vergunninghouder.

Datum:

11 augustus 2023

Aanvraagnummer:

AVD11500202316683-1

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

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

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

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

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.

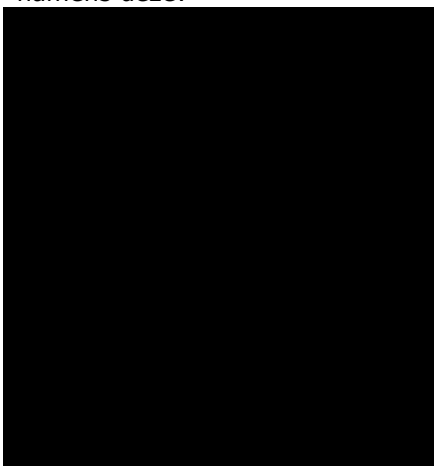
Datum:

11 augustus 2023

Aanvraagnummer:

AVD11500202316683-1

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:





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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

The cardiac conduction system (CCS) is a highly specialized network of cardiomyocytes within the heart that generate and transmit electrical impulses throughout the heart muscle to coordinate contraction. The

main components of the cardiac conduction system are the sinoatrial node (SAN), atrioventricular node (AVN), bundle of His, bundle branches, and Purkinje fibres (Figure 1).

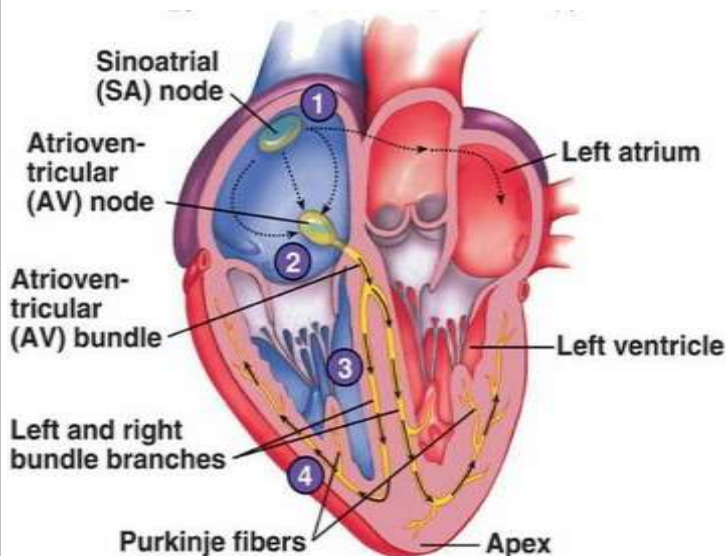


Figure 1: Basic anatomy of the cardiac conduction system. The impulse is formed in the SAN (1), and subsequently conducted to the AV node (2), AV bundle (bundle of His), the left and right bundle branches (3), and Purkinje fibers (4).

Atrioventricular block (AV block) is a type of heart block that occurs when the electrical signal traveling from the atria, or the upper chambers of the heart, to ventricles, or the lower chambers of the heart, is impaired.

Ageing and age-related diseases (hypertension, ischemic heart disease, heart failure) are associated with degenerative processes in the heart such as AV block, one of the most common reasons for pacemaker implantation [1]. AV block may also occur in the absence of significant cardiac disease and is generally attributed to idiopathic fibrosis of the conduction system [2]. At present, the ultimate cause of this fibrosis is not fully understood. Less severe conduction abnormalities, such as PR prolongation [3] and right [4] and left [5] bundle branch block (BBB), are known to be associated with more severe forms of AV block requiring a pacemaker.

Although pacemakers can usually provide adequate treatment of the symptoms of AV block, no preventive or curative strategies are currently used in clinical practice (Figure 2). Despite years of research and development, pacemaker therapies are still suboptimal and impose a risk of serious complications, such as pneumothorax, cardiac tamponade, and death [6]. After implantation, patients require generator changes, which carry a particularly high risk of infection and resultant endocarditis [7]. Finally, independent of these procedural complications, even successful pacemaker therapy is still associated with an unsatisfactory prognosis [8-10].

In addition to highly prevalent, mainly age-related AV block, congenital complete heart block (CCHB) is a rare but life-threatening disorder, affecting approximately 1:15,000–1:20,000 live births, and is defined as a complete atrioventricular (AV) block occurring *in utero* or within the first month of life [11; 12].

The heart rates can slow to below 55 beats per minute (bpm), while normal foetal and neonatal heart rates are 120-160 bpm. This leads to developmental delay, heart failure and/or death. Of the children who survive through birth, over 65% need electronic pacemaker treatment in the first month postpartum. This confers major risks and further contributes to morbidity and mortality. Overall mortality is 20% of which the vast majority of deaths occur in utero and the first three months postpartum. For these high-risk CCHB patients, there is no effective treatment, because implantation of electronic pacemakers is not feasible, due to incompatible pacemaker size, limited surgical access options and frailty of *in utero* or early post-

partum patients. Thus, due to pressing unmet clinical need, CCHB is considered the most severe and life-threatening foetal and neonatal cardiac arrhythmia and has been identified as a prime indication for gene-therapeutic approaches.

Even as electronic pacemakers become smaller and less invasive, new alternatives are needed to expand the therapeutic armamentarium for conduction system disorders. Biological pacemakers, generated by gene transfer can provide those alternatives to electronic devices.

Aetiologies of CCS diseases are multi-facetted, multi-causal and sometimes idiopathic. [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] Functional targets and potential therapeutic genes will be picked from literature and *in vitro* screening experiments.

Gene and cell therapy strategies provide a mechanism-based treatment of AV block. Over the past two decades cardiac gene therapy has evolved from an experimental research tool to a high-potential therapeutic strategy targeting a broad variety of disorders. For instance, long-term expression of transgenes using the adeno-associated virus (AAV) vector system has emerged as a promising tool. Gene therapy treatments have been approved for use in humans, with a growing number of clinical trials targeting multiple organ systems, including the heart.

Controlled and localized delivery of the gene therapy vectors is of critical importance for potential therapeutic efficacy. Since the CCS is a highly organized structure spanning various anatomic regions of the heart, therapeutic genes need to be delivered precisely in clearly defined locations to exert the desired effect [13]. Since different regions in the heart need to be targeted and reached by vectors, various delivery routes need to be assessed, depending the given vector-transgene combination and the expected mechanistic effect.

A multitude of delivery approaches have been used, specifically in large animal models, which confer the critical advantage of allowing clinically applicable approaches, due to comparable heart size and physiology with human patients. Therapeutic factors have successfully been delivered [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

International research, including own publications contributions [REDACTED] in the field of biological therapies for CCS disease has made substantial progress in the past decade from new discoveries and developments in the field of [REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] Future studies will be based on the group's past and on-going activities with various species- and target-cell-optimized [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

The current consensus is that pacemaker and conduction system disorders derive from a [REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] Our aim therefore is to develop therapies that can eventually address both these issues. Moreover, we aim to develop strategies that are preferably universally applicable, e.g., [REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] The hypothesis here is that

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] Further unravelling this process is therefore among our main goals.

Finally, progress will be made for delivery of gene and cell therapeutics. This will be with respect to cardiac specific viral vectors and instrumentation to localise, access and apply the therapeutics to the desired target area of the diseased heart.

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 clinically applicable, gene-based therapies for AV block, as an alternative or supplement to conventional therapies.

The three immediate goals of this project are

- [REDACTED]
[REDACTED]
- [REDACTED]
[REDACTED]
- [REDACTED]
[REDACTED]

Progress in both immediate goals will directly contribute to eventually achieving the ultimate goal, by establishing and validating fundamental technology, i.e., delivery of gene-based therapeutics, and assessing therapeutic efficacy in mechanistically and physiologically meaningful animal models.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

Our group is embedded in two departments of our institution with expertise in animal cardiac electrophysiology in various animal models (mice, rats, guinea pigs, dogs, pigs) for more than 50 years. Furthermore, development of viral vector technology has been a focus in recent years.

Researchers have full access to state-of-the-art equipped laboratories and animal facilities to ensure effective implementation and progress of the project and enabling exchange of expertise, protocols and materials.

Our multidisciplinary team is complementary and currently composed of six technicians (with expertise in animal and *in vitro* work), three group leaders (with biological and medical/cardiology backgrounds), five post-docs (biology and medical backgrounds), and six PhD students (biology and medical backgrounds).

New personnel has been recruited, incl. two PostDocs, two PhD students and two technicians and the group has access to additional facilities (UMC Utrecht and other national and international collaborators). Specifically, two technicians will dedicate 20% fte and two PhD students will dedicate 50% fte for this project. Two PostDocs (20% fte) will supervise and coordinate. At least two group leaders/PIs (10% fte) will overlook, guide and make strategic decisions.

Several research groups within the institute, and on national and international level will collaborate in this project to ensure outstanding expertise. Although all methods and techniques proposed here are established within our research group, collaborations and scientific exchange will ensure that emerging technologies and unpublished findings, with respect to potential duplication of experiments or new ways to improve animal welfare, will be recognized and implemented in the project.

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 (specified in the appendices).

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

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

The development of biological pacemakers has greatly been enhanced by concomitant discoveries of the basic biological mechanisms of pacemaking and coordinated conduction of electrical impulses through the heart. Myocytes with pacemaker function are fundamentally different from working myocardial cells. A key discovery is [REDACTED]

Own research has confirmed this potential [REDACTED] and by conducting the proposed project, we aim at opening up a translational pathway from basic research via valid animal models towards biological therapies of CCS disease. The model used for this project will be an established and well recognized large animal disease model for AV block. It is based on catheter-based radiofrequency (RF) ablation of the His bundle, resulting in interruption of the cardiac conduction system from the atria to the ventricles, i.e., complete AV block.

Cardiac arrhythmias are usually classified as tachyarrhythmias or bradyarrhythmias. A complete AV block is a severe kind of bradyarrhythmia. The causes of pathological AV block in the human population are varied and include ischaemia, infarction, fibrosis or drugs. Patients with complete heart block are frequently hemodynamically unstable, and as a result, they may experience hypotension, syncope, cardiovascular collapse, malignant arrhythmias, or even death. So far, the implantation of a pacemaker is generally accepted as a main therapy for this disease in clinic.

Since all the described symptoms and complications would also be expected in a large animal model of induced complete AV block, an electronic pacemaker will be implanted in the animals before inducing the AV block to keep them viable over the course of the study and also to be able to detect therapeutic success from the planned gene-therapeutic interventions via monitoring of pacemaker dependency. This model has been established by our group in cooperation with the Department of Heart & Lungs, UMC Utrecht.

The scientific validity is emphasized by multiple high-impact publications [26-29] using this model and we expect that results from this pre-clinical model will be required by national and European regulatory authorities to initiate clinical trials.

Thus, based on results from the envisioned study, as assessed by pacemaker dependency as the primary endpoint, but also via additional secondary endpoints (echo, blood markers, telemetric assessment of ECG and activity, and others) will allow choosing for promising candidate therapeutics to explore further in the translational pipeline and potentially include in clinical trials.

In addition, researchers working in the field of gene and cell therapy will benefit from the results and practical experience gained from this project, not only for heart disease, but also for developing new gene and cell therapies for other diseases. New technologies will be used to identify therapeutic genes and cells. Tools and procedures to deliver the genes and cells to specific locations in the diseased heart will be developed and used. And finally, methods will be developed to analyse how these new therapies actually

work, all of which will ultimately be of benefit to patients once the technology becomes available in clinical practice.

Social relevance:

Ageing and age-related diseases (hypertension, ischemic heart disease, heart failure) are associated with degenerative processes in the heart that cause significant morbidity. Degeneration of the CCS, in particular its major components being the SAN and AVN, leads to debilitating slow heart rate (i.e., bradycardia). Current, state-of-the-art, treatment for CCS dysfunction is electronic pacemaker implantation. Annually, 480,000 implantations are performed in Europe alone. Although electronic pacemakers can be used to treat slow heart rhythm disorders, there are still many drawbacks to this treatment, such as a decline in heart function, a suboptimal acceleration of the rhythm during exercise, and the risk of potentially life-threatening infections of the heart [30-34]. Therefore, new alternatives are needed to provide better treatment options for patients with slow cardiac arrhythmias.

Biological pacemakers, which can be generated using gene or cell therapies, can provide new alternatives without the drawbacks of conventional electronic pacemakers. Since slow cardiac arrhythmias cannot be cured so far, but can only be treated symptomatically, patients will have much better treatment first of all, as it will be causal, meaning the cause of their disease will be eliminated and repeated visits to the doctor avoided to continue symptomatic treatment. In addition, patients' quality of life will improve due to fewer symptoms and an overall longer life.

Positive effects can also be expected in clinical practice. The overall workload will decrease for clinicians treating patients with slow cardiac arrhythmias because the treatment is mechanistically better (more physiological) and requires less intensive follow-up. Naturally, this also has a positive socio-economic effect, as a result of which less money has to be spent on this specific patient group and thus becomes available for other social needs.

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

- Patients and patient organizations
 - Improved treatment for CCS disease (quality of life ↑, mortality ↓, morbidity; e.g., reduced heart pump function/heart failure ↓).
 - Less side effects of treatment for CCS disease (e.g., infections of electronic pacemaker components).
 - Curative treatment of CCS disease with fewer follow-up examinations.
- Clinicians and clinical sector
 - Curative treatment with less re-administrations.
 - Establishment of novel alternative or complementary therapy.
- Researchers
 - Progress of knowledge in the field of cell and gene therapy.
 - Insights into AV block aetiology and new targets for treatment.
 - Progress in careers of researchers involved based on findings from proposed project.
- Medical technology
 - Progress in the field of clinically applicable vector development.
 - New opportunities for specific delivery device development.
- Animals
 - Applying animal welfare within project constraints by minimizing numbers (see 3Rs: reduction and replacement) and minimizing distress (see 3Rs: refinement). These animals have a negative interest because they will experience pain, stress and will be killed to analyse the heart tissue.

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.

The overall design of the project strategy is determined by the indicated immediate goals of the project. In order to achieve the described subgoals 1) identification of potentially functional gene-therapy vector-transgene combinations, and 2) translatable delivery procedures for efficient and effective transgene expression, these will be approached separately in the initial phase of the project. Once both immediate goals have been reached successfully (assessed and controlled via clearly defined Go/No-Go decision points; Figure 2), the project will enter the next phase, where both approaches are combined to validate subgoal 3) validation of effective treatment of AV block by gene therapy in pre-clinical models.

The overall strategy (Figure 3) for this approach will thus be as follows:

1. Gene therapeutics will be tested and validated *in vitro*.
 - Go/No-Go 1: Function (i.e., induction of [REDACTED]) The exact threshold will be determined per [REDACTED] expected outcomes. In any case it will relate to [REDACTED]
2. Delivery methods for gene therapeutics to animal models will be tested and validated.
 - Go/No-Go 2: Delivery efficacy (i.e., ratio of [REDACTED]) Here the threshold will be set at [REDACTED]

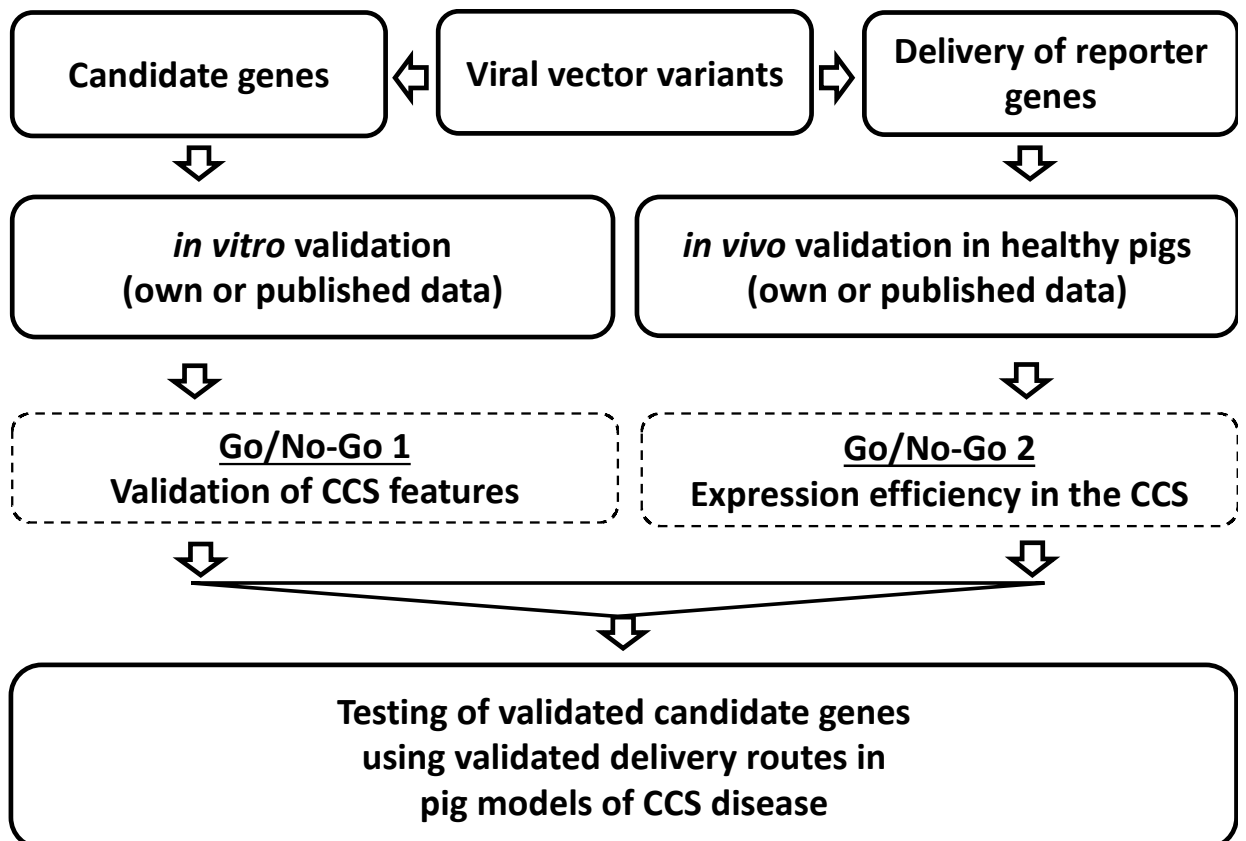


Figure 2: Strategy to develop gene therapy for AV block in pigs.

Optimization of [REDACTED] will be conducted using [REDACTED]. These studies will focus on [REDACTED]. For targeting [REDACTED]. To achieve [REDACTED]. This technique is based on [REDACTED]. Finally, [REDACTED] in order to investigate this least invasive and clinically most desirable option.

Once the [REDACTED]. The model used for this project will be an established and well recognized large animal disease model [REDACTED].

Overall, the combined approaches will cover the currently available spectrum of biological interventions to treat AV block [REDACTED] in order to achieve

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

This multi-layered approach will provide sufficient scope and complementarity to gain insights into new options for biological and curative treatment of AV block.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The strategy outlined above, covers separate optimization of therapeutic transgene-vector combinations and delivery strategies, validated *in vitro* and *in vivo*. We are convinced that the current state of biological therapeutics (transgenes) and delivery technology (viral vectors and access routes to the target area of the heart) justifies their use in a mechanistically and physiologically valid animal model (described in more detail in 3.3.1) to progress this field of research.

Candidates for gene and cell therapeutics will be identified through own research on [REDACTED].

By introducing specific go / no-go decision points in critical steps of the study we feel to act scientifically sound, solid and responsibly, while maximising chances for success, which ultimately would mean clinical translation.

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 | Investigation and development of gene therapy for AV block using porcine models |
| | |

References

1. Bernstein, A.D. & Parsonnet, V. Survey of cardiac pacing and defibrillation in the United States in 1993. *Am J Cardiol* 78, 187-196 (1996).
2. Zoob, M. & Smith, K.S. The Aetiology of Complete Heart-Block. *Br Med J* 2, 1149-1153 (1963).
3. Cheng, S. et al. Long-term outcomes in individuals with prolonged PR interval or first-degree atrioventricular block. *JAMA* 301, 2571-2577 (2009).
4. Bussink, B.E. et al. Right bundle branch block: prevalence, risk factors, and outcome in the general population: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Heart J* 34, 138-146 (2013).
5. Eriksson, P., Wilhelmsen, L. & Rosengren, A. Bundle-branch block in middle-aged men: risk of complications and death over 28 years. The Primary Prevention Study in Goteborg, Sweden. *Eur Heart J* 26, 2300-2306 (2005).
6. Boink, G.J., Christoffels, V.M., Robinson, R.B. & Tan, H.L. The past, present, and future of pacemaker therapies. *Trends Cardiovasc Med* 25, 661-673 (2015).
7. Boink, G.J. et al. HCN2/Skm1 gene transfer into canine left bundle branch induces stable, autonomically responsive biological pacing at physiological heart rates. *J Am Coll Cardiol* 61, 1192-1201 (2013).
8. van Eif VWW, Stefanovic S, van Duijvenboden K, Bakker M, Wakker V, de Gier-de Vries C, Zaffran S, Verkerk AO, Boukens BJ, Christoffels VM. Transcriptome analysis of mouse and human sinoatrial node cells reveals a conserved genetic program. *Development*. 2019 Apr 25; 146(8):dev173161. doi: 10.1242/dev.173161. PMID: 30936179.
9. Boink, G.J. et al. Ca(2+)-stimulated adenylyl cyclase AC1 generates efficient biological pacing as single gene therapy and in combination with HCN2. *Circulation* 126, 528-536 (2012).
10. Boink GJ, Verkerk AO, van Amersfoort SC, Tasseront SJ, van der Rijt R, Bakker D, Linnenbank AC, van der Meulen J, de Bakker JM, Seppen J, Tan HL. Engineering physiologically controlled pacemaker cells with lentiviral HCN4 gene transfer. *J Gene Med*. 2008 May; 10(5): 487-97. doi: 10.1002/jgm.1172. PMID: 18383475
11. Fischbach PS, Frias PA, Strieper MJ, Campbell RM. Natural history and current therapy for complete heart block in children and patients with congenital heart disease. *Congenit Heart Dis*. 2007 Jul-Aug; 2(4): 224-34. doi: 10.1111/j.1747-0803.2007.00106.x. PMID: 18377473.
12. Campbell R, Fischbach P, Frias P, Strieper M, Congenital Complete Heart Block, *European Cardiovascular Disease* 2007; 3(2): 111-2
13. Cannatà A, Ali H, Sinagra G, Giacca M. Gene Therapy for the Heart Lessons Learned and Future Perspectives. *Circ Res*. 2020 May 8; 126(10): 1394-1414. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.315855. Epub 2020 May 7. PMID: 32379579.
14. Koudstaal S, Bastings MM, Feyen DA, Waring CD, van Slochteren FJ, Dankers PY, Torella D, Sluijter JP, Nadal-Ginard B, Doevendans PA, Ellison GM, Chamuleau SA. Sustained delivery of insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor stimulates endogenous cardiac repair in the chronic infarcted pig heart. *J Cardiovasc Transl Res*. 2014 Mar; 7(2): 232-41. doi: 10.1007/s12265-013-9518-4. Epub 2014 Jan 7. PMID: 24395494; PMCID: PMC3935103.
15. Schotman MJG, Peters MMC, Krijger GC, van Adrichem I, de Roos R, Bemelmans JLM, Pouderoijen MJ, Rutten MGTA, Neef K, Chamuleau SAJ, Dankers PYW. In Vivo Retention Quantification of Supramolecular Hydrogels Engineered for Cardiac Delivery. *Adv Healthc Mater*. 2021 May; 10(10):e2001987. doi: 10.1002/adhm.202001987. Epub 2021 Feb 15. PMID: 33586317.
16. Kikuchi K, McDonald AD, Sasano T, Donahue JK. Targeted modification of atrial electrophysiology by homogeneous transmural atrial gene transfer. *Circulation*. 2005 Jan 25; 111(3): 264-70. doi: 10.1161/01.CIR.0000153338.47507.83. Epub 2005 Jan 10. PMID: 15642761.
17. Liu Z, Hutt JA, Rajeshkumar B, Azuma Y, Duan KL, Donahue JK. Preclinical efficacy and safety of KCNH2-G628S gene therapy for postoperative atrial fibrillation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017 Nov; 154(5): 1644-1651.e8. doi: 10.1016/j.jtcvs.2017.05.052. Epub 2017 May 23. PMID: 28676183; PMCID: PMC6450389.

18. Scimia MC, Sydnes KE, Zuppo DA, Koch WJ. Methods to improve cardiac gene therapy expression. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2014 Nov; 12(11): 1317-26. doi: 10.1586/14779072.2014.967683. PMID: 25340284.
19. Mohan RA, Mommersteeg MTM, Domínguez JN, Choquet C, Wakker V, de Gier-de Vries C, Boink GJJ, Boukens BJ, Miquerol L, Verkerk AO, Christoffels VM. Embryonic Tbx3+ cardiomyocytes form the mature cardiac conduction system by progressive fate restriction. *Development.* 2018 Sep 3; 145(17): dev167361. doi: 10.1242/dev.167361. PMID: 30042181
20. Boink GJ, Robinson RB. Gene therapy for restoring heart rhythm. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2014 Sep; 19(5): 426-38. doi: 10.1177/1074248414528575. Epub 2014 Apr 17. PMID: 24742766.
21. Boink GJ, Rosen MR. Regenerative therapies in electrophysiology and pacing: introducing the next steps. *J Interv Card Electrophysiol.* 2011 Jun; 31(1): 3-16. doi: 10.1007/s10840-010-9529-x. Epub 2010 Dec 16. PMID: 21161675
22. Mohan RA, Bosada FM, van Weerd JH, van Duijvenboden K, Wang J, Mommersteeg MTM, Hooijkaas IB, Wakker V, de Gier-de Vries C, Coronel R, Boink GJJ, Bakkers J, Barnett P, Boukens BJ, Christoffels VM. T-box transcription factor 3 governs a transcriptional program for the function of the mouse atrioventricular conduction system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Aug 4; 117(31): 18617-18626. doi: 10.1073/pnas.1919379117. Epub 2020 Jul 16. PMID: 32675240; PMCID: PMC7414162.
23. Végh AMD, Verkerk AO, Cócera Ortega L, Wang J, Geerts D, Klerk M, Lodder K, Nobel R, Tijssen AJ, Devalla HD, Christoffels VM, Medina-Ramírez M, Smits AM, Tan HL, Wilders R, Goumans MJTH, Boink GJJ. Toward Biological Pacing by Cellular Delivery of Hcn2/SkM1. *Front Physiol.* 2021 Jan 6; 11: 588679. doi: 10.3389/fphys.2020.588679. PMID: 33488393; PMCID: PMC7815531.
24. Bakker ML, Boink GJ, Boukens BJ, Verkerk AO, van den Boogaard M, den Haan AD, Hoogaars WM, Buermans HP, de Bakker JM, Seppen J, Tan HL, Moorman AF, 't Hoen PA, Christoffels VM. T-box transcription factor TBX3 reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells. *Cardiovasc Res.* 2012 Jun 1; 94(3): 439-49. doi: 10.1093/cvr/cvs120. Epub 2012 Mar 14. PMID: 22419669.
25. Kapoor, N., Liang, W., Marban, E. & Cho, H.C. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18. *Nat Biotechnol* 31, 54-62 (2013)
26. Dawkins JF, Hu YF, Valle J, Sanchez L, Zheng Y, Marbán E, Cingolani E. Antegrade Conduction Rescues Right Ventricular Pacing-Induced Cardiomyopathy in Complete Heart Block. *J Am Coll Cardiol.* 2019 Apr 9; 73(13): 1673-1687. doi: 10.1016/j.jacc.2018.12.086.
27. Cingolani E, Yee K, Shehata M, Chugh SS, Marbán E, Cho HC. Biological pacemaker created by percutaneous gene delivery via venous catheters in a porcine model of complete heart block. *Heart Rhythm.* 2012 Aug; 9(8): 1310-8. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.04.020. Epub 2012 Apr 20.
28. Wolfram JA, Donahue JK. Gene therapy to treat cardiovascular disease. *J Am Heart Assoc.* 2013 Aug 20; 2(4): e000119. doi: 10.1161/JAHA.113.000119.
29. Greener I, Donahue JK. Gene therapy strategies for cardiac electrical dysfunction. *J Mol Cell Cardiol.* 2011 May; 50(5): 759-65. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.07.022. Epub 2010 Aug 7.
30. Pfeiffer, D. et al. Complications of pacemaker-defibrillator devices: diagnosis and management. *Am Heart J* 127, 1073-1080 (1994).
31. Bloom, H. et al. Renal insufficiency and the risk of infection from pacemaker or defibrillator surgery. *Pacing Clin Electrophysiol* 29, 142-145 (2006).
32. Gang, U.J. et al. High-degree atrioventricular block complicating ST-segment elevation myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention. *Europace* 14, 1639-1645 (2012).
33. Simon, A.B. & Zloto, A.E. Atrioventricular block: natural history after permanent ventricular pacing. *Am J Cardiol* 41, 500-507 (1978).
34. Bradshaw, P.J., Stobie, P., Knuiman, M.W., Briffa, T.G. & Hobbs, M.S. Life expectancy after implantation of a first cardiac permanent pacemaker (1995-2008): A population-based study. *Int J Cardiol* 190, 42-46 (2015).



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

| | | | |
|-----|---|-------------------------|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 11500 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Academic Medical Center | |
| 1.3 | List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number | Type of animal procedure |
| | | 1 | <i>Investigation and development of gene therapy for AV block using porcine models</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.

In order to investigate translatable gene therapy approaches for AV block we will conduct two substudies in pigs. As outlined in the project proposal and in line with the description of the overall project strategy (3.4.1), we will first assess [REDACTED]. Specifically, we will focus on clinically translatable procedures and [REDACTED] assessment of clinically relevant parameters [REDACTED] to assess therapeutic potential.

Substudy 1. Optimizing gene delivery strategies and validating transgene expression efficiency

Various delivery methods in combination with vectors and transgene modifications (e.g. [REDACTED]) will be used for local or systemic administration to find conditions and combinations for highest transduction and expression efficacy. According to the overall strategy described in the Project Proposal, 3.4.1, only *in vitro* validated and/or published in other, less clinically translatable animal approaches will be included. Healthy wild type animals will be used.

Primary outcome parameter: Transgene-positive targeted cell type in the targeted region as assessed by gene or protein expression analysis.

Substudy 2. Gene therapy in the context of AV block.

Approaches validated in substudy 1 will be used to investigate potential [REDACTED]. This animal model requires [REDACTED], and is also the standard treatment in human [REDACTED].

Primary outcome parameter: [REDACTED]

See Figures 1 and 2 for possible sequence of procedures in timelines of substudies 1 and 2, respectively.

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

Animal procedures listed will be combined for individual studies. According to the described overall strategy studies will first be following the substudy 1 scheme ([REDACTED]) before moving to studies comprising substudy 2 ([REDACTED]). See Figures 1 and 2 for possible sequence of procedures in timelines of substudies 1 and 2, respectively.

1. [REDACTED] Telemetry implantation / A [REDACTED]
Animals will be sedated, anaesthetised, analgetised, immobilised on the operation table, attached to vital signs monitoring (body temperature, ECG), intubated and ventilated. Before the [REDACTED] induction can be conducted [REDACTED] will be implanted following routines used in human patients. After vascular access has been established, the [REDACTED] will be moved into the right ventricular lumen and screwed into the apical wall. Then the lead will be connected

to the [REDACTED] controller which will be implanted subcutaneously in the neck of the animal. The small incisions necessary will be closed by stitches.

Duration: 30 minutes; Justification: Establishment [REDACTED]

A telemetry probe might be implanted before or after the pacemaker to allow for continuous, non-invasive monitoring of vital parameters (e.g., ECG, body temperature, activity). The probe and attached electrodes will be placed subcutaneously in the neck-chest region. The small incisions necessary will be closed by stitches.

Duration: 30 minutes; Justification: Continuous monitoring of vital parameters.

For induction of [REDACTED] vascular access will be established via the jugular or femoral vein and a specific [REDACTED]. Using an electronic electrophysiology (EP) system the location of the [REDACTED]. The success of the procedure will be validated by [REDACTED]

Duration: 2 hours; Justification: Establishment of a clinically relevant disease model.

Total duration for all three procedures in the same operation [REDACTED]

3 hours; Justification: See individual justifications, combined.

2. Immunosuppression

To limit immune reaction to delivered gene-therapy vectors installation of immunosuppression regimes can be indicated. Thereby expression levels of delivered [REDACTED] can be improved and adverse inflammatory reaction affecting the wellbeing of the animal can be avoided. Immunosuppressants will preferably be administered orally, usually starting 7 days before vector injection, by mixing with food and fed in a controlled way by animal caretakers. If necessary, immunosuppressants can also be administered via a fixed venous line (see point 11.).

Duration: variable (e.g., 2x daily for 5 minutes during feeding); Justification: [REDACTED]

[REDACTED] avoid potential immunological side-effects.

3. 12-lead ECG and non-invasive electrophysiological studies

Animals will be sedated and immobilized on the operation table, attached to vital signs monitoring (body temperature, ECG), intubated and ventilated. Electrophysiological studies will be conducted non-invasively using the pacemaker programmer and specific ECG recording set-ups.

Duration: 1 hour, max 1x/week; Justification: Least invasive and quickest method for assessing electrophysiological properties of the heart.

4. Invasive electrophysiological studies

Animals will be sedated, anaesthetised, analgetised, immobilized on the operation table, attached to vital signs monitoring (body temperature, ECG), intubated and ventilated. After establishing vascular access a stimulation catheter will be manoeuvred to the ventricular lumen and specific localized stimulation protocols will be conducted to get detailed insights into electrophysiological properties of precisely defined regions of the heart. This procedure will only be performed in terminal experiments.

Duration: 1 hour; Justification: Least invasive and quickest method for assessing electrophysiological properties of the heart.

5. Systemic delivery of [REDACTED]

After sedation the animal will receive [REDACTED]

Duration: 30 minutes; Justification: Least invasive method for delivery of [REDACTED]

6. Local delivery of [REDACTED] by surgical open-chest access the heart

Animals will be sedated, anaesthetised, analgetised (peripheral and local), immobilized on the operation table, attached to vital signs monitoring (body temperature, ECG), intubated and

ventilated. After shaving and disinfection, 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 full or partial 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 [REDACTED] [REDACTED], with optional [REDACTED] [REDACTED] if access to the injection site allows and will be performed using [REDACTED] [REDACTED] have been validated in human settings or been validated as being safe (own or published data). Alternatively, a maximum of [REDACTED] [REDACTED]

Duration: 3 hours; Justification: Highest precision for [REDACTED] [REDACTED] due to direct visualisation.

7. Local delivery of [REDACTED] [REDACTED]
Animals will be sedated, anaesthetised, analgetised, immobilized on the operation table, attached to vital signs monitoring (body temperature, ECG), intubated and ventilated. After establishing vascular access an optional mapping catheter will be introduced into the ventricular lumen to generate an endocardial map (e.g., depicting electromechanical parameters). Eventually, an [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] Alternatively, a maximum of 5 ml will be [REDACTED] [REDACTED] This procedure will be performed only once per individual animal experiment.

Duration: 3 hours; Justification: Least invasive and clinically most translatable method for [REDACTED] [REDACTED]

8. Non-invasive echocardiography studies
Animals will be sedated, anaesthetised, immobilized 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 of cardiac function and morphology.

9. Invasive Pressure-Volume Loop measurement
Animals will be sedated, anaesthetised, analgetised, immobilized on the operation table, attached to vital signs monitoring (body temperature, ECG), intubated and ventilated. After vascular access is established PV-loop measurements are performed. Three successive measurements are **recorded in rest and during hyperaemia, achieved by intracoronary administration of 60 µg adenosine**. Duration: 1 hour at terminal timepoint; Justification: Standard procedure to assess hemodynamics.

10. Blood sampling (sedated)
Blood is sampled from the ear vein or other accessible veins while animals are sedated, preferably in combination with other experimental procedures to minimize total numbers of sedations during the course of a study, first one week after vector injection. Blood sampling allows for continuous monitoring of markers for inflammation and cardiac damage. Also, it allows for monitoring potential vector distribution in the peripheral blood.

Duration: 10 minutes; Justification: Least invasive and most efficient method for sporadic blood samplings (max. 1x per week, max. 5 ml per sampling).

11. Blood sampling (fixed line)

To be able to monitor blood markers more frequently (more than 1x per week), and without the need to sedate animals, a fixed venous line (catheter) will be installed. The decision for sedated blood sampling versus fixed line will be made in accordance with the local animal welfare body (IvD) and veterinarian. To install the fixed line a neck incision is made to get access to carotid and jugular vein during full anaesthesia and appropriate analgesia in the course of the AV block procedure (see point 1.). A central external line is placed in the neck connected to the jugular vein allowing easy and convenient blood sampling after infarct induction in a conscious animal during follow-up. This external line requires daily flushing, but is a fully established procedure in the facility. Animals will receive extra attention and food during the flushing and blood sampling and react well to the intervention. The fixed line can be removed without any distress to the animal at any given time during the experiment (e.g., when the analyses of the blood markers have reached a conclusive state).

Duration: 10 minutes; Justification: Least invasive and most efficient method for frequent blood samplings (max. 2x per week; max. 5 ml per sampling).

12. Single housing

Single housing is necessary for animals with fixed venous lines, but wellbeing will be improved by housing that allows sight and nose contact with neighboring animals.

Duration: maximum 70 days; Justification: To prevent nibbling of pen mates on bandages, wounds or catheters, which would result in infections and complications.

13. MRI to assess cardiac function and remodelling

Animals will be sedated, anaesthetised, analgetised, immobilized on the operation table, attached to vital signs monitoring (body temperature, ECG), intubated and ventilated. MRI scans will be performed after transport to a specialized facility (Veterinary medicine, UU, on campus).

Duration: 3 hours; Justification: Gold standard for assessment of cardiac function and remodelling (max. 3 MRI procedures per animal, with at least 2 weeks of recovery time).

For Substudy 1, with a maximum follow-up time of 56 days, the maximum number of anesthesia/sedations will be 8 (2x anesthesia for injection and termination on d0 and d56, respectively, and 6x sedation for weekly blood sampling and 12-lead ECG, from d7 to d49). The minimum recovery time will be 1 week.

For Substudy 2, with a maximum follow-up time of 70 days, the maximum number of anesthesia/sedations will be 11 (3x anesthesia for AV block, injection and termination on d0, d28 and d70, respectively, and 8x sedation for weekly blood sampling and 12-lead ECG, from d7 to d63). The minimum recovery time will be 1 week.

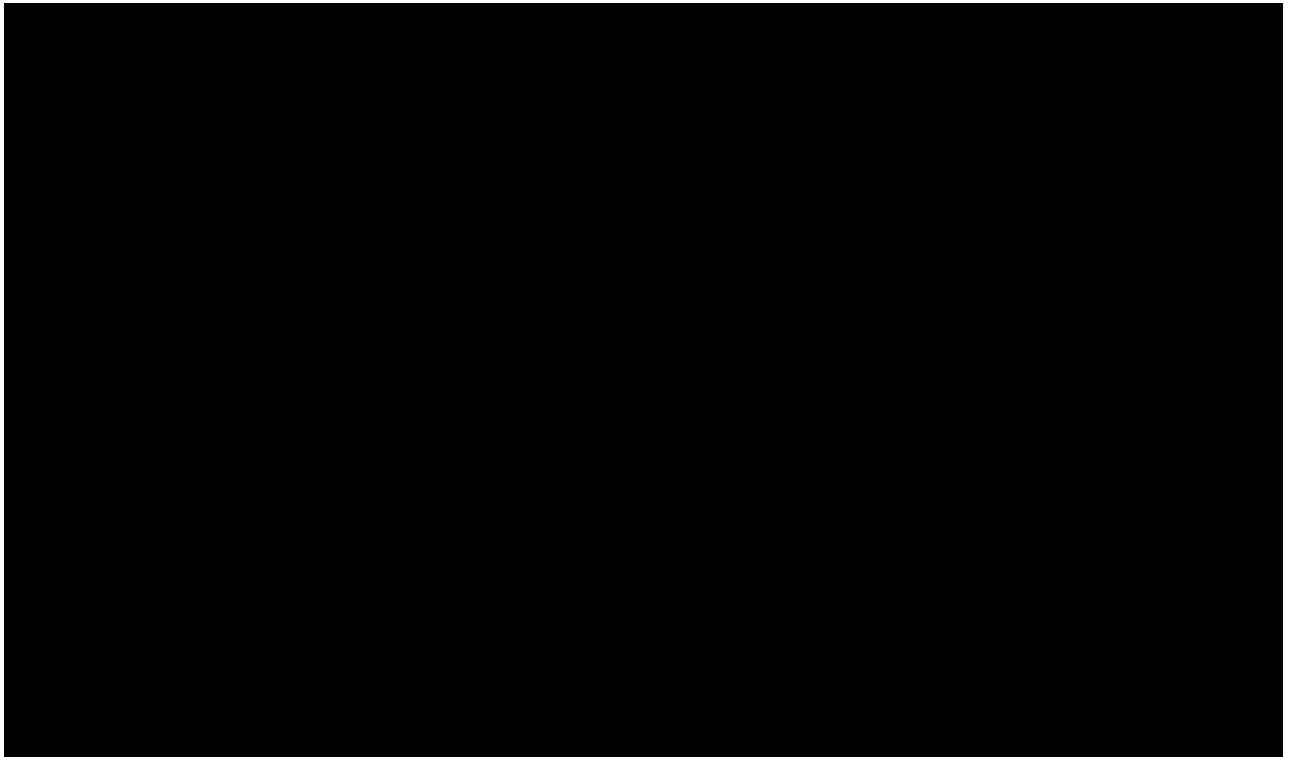


Figure 1: General overview of animal procedures timeline for studies within Substudies 1 (dashed boxes indicate optional procedures).

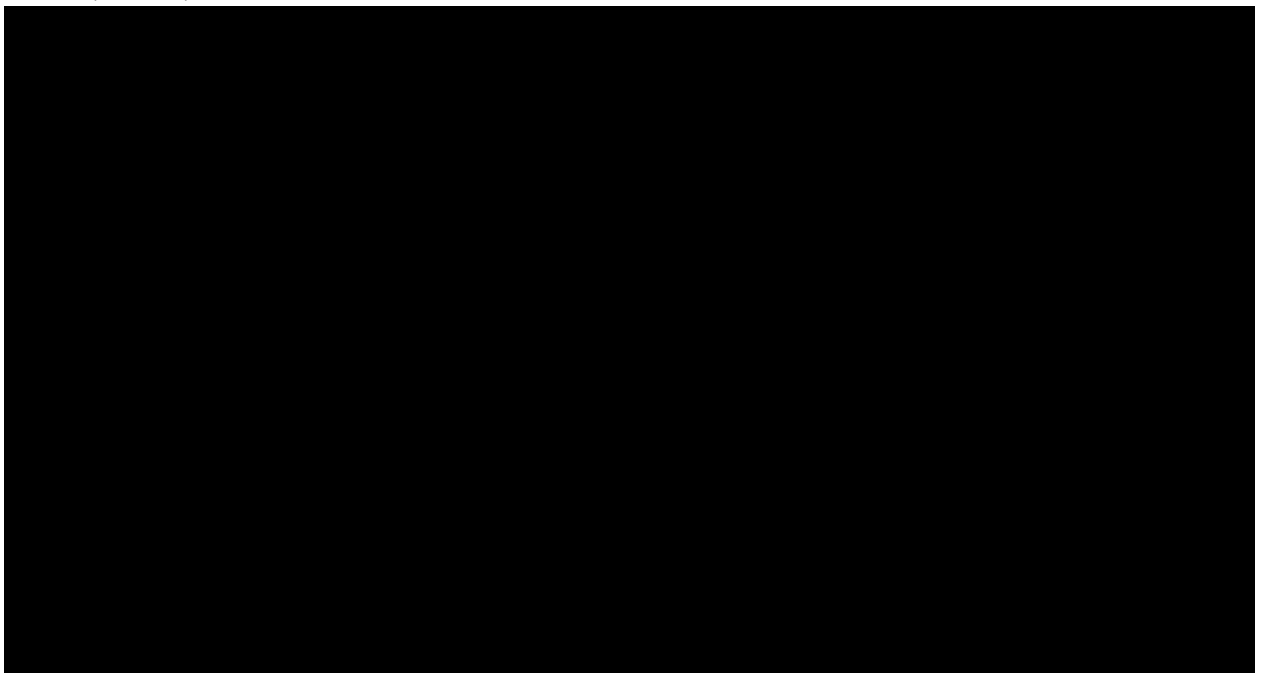


Figure 2: General overview of animal procedures timeline for studies within Substudies 2 (dashed boxes indicate optional procedures).

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

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 (echo, MRI, CT, PV-loops) as structural measurements (blood, tissue etc). Within our department and with contacts at UMCU, we have access to expertise for

histology, blood analysis and pathology incl. immune responses and who also may use blood or tissue from the same pigs.

Based on literature and preliminary research, we aim to test only therapies from which we can expect a positive effect.

For statistics, we aim for study effects that are clinically relevant and feasible. We have based expectations for effect sizes and standard deviations on previous studies and published results. For Substudy 2 we will observe and compare the disease condition (AV block), e.g., by monitoring pacemaker dependency, before and after treatment. This might reduce the need for extensive untreated control groups, but needs to be assessed during the course of the project.

Furthermore, highly skilled and experienced biotechnicians will help minimize variations.

We will power group sizes sufficiently using appropriate statistical methods (power: 80% and alpha: 0.05) with support from specialized biostatisticians. The power calculations will be based on the primary endpoints, as described, and expected effect sizes from own or published research.

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 / Substudy | Species | Origin | Life stage | Number | Gender | Genetically altered | Strain* |
|--------------------------|---------|---------------------|------------|--------|-----------------|---------------------|--------------------------|
| 1+2 | pig | registered breeding | Adult | 480 | Male and female | no | Landrace / Yorkshire pig |

Animal species and strain

Pigs are considered valid animal models for research on cardiovascular disease and especially for the development of new therapeutic approaches with potential for translation to human patients. Pig hearts are very similar to human hearts in size and physiology. This is also true for pathophysiology and induction of heart disease, e.g., in response to an ischemic insult, leading to myocardial infarction or, as described here, damage to the cardiac conduction system, leading to a life-threatening conduction block, which makes the implantation of an electronic pacemaker necessary, which is in fact the same model that would be used in a human patient. Furthermore, new therapeutic agents (in our case a gene therapy vector) will be delivered in ways that can only be simulated in human size hearts (e.g., direct subepicardial and catheter-based intramyocardial injections of effective volumes precisely into predefined target areas). Lastly, the porcine and human immune system and metabolism share similarities, which are relevant for assessing potential adverse side-effects in response to gene therapy vectors, and have been increasingly used in high profile publications on gene therapy for cardiac disease (Liu et al., *Science Transl Med*, 2021, PMID: 34193613; Moretti et al., *Nature Med*, 2020, PMID: 31988462; Dawkins et al., *JACC*, 2019, PMID: 30947921; Gabisonia et al., *Nature*, 2019, PMID: 31068698).

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.

Life stages: We will use juvenile pigs (toddlers / pubers; 3 to 6 month old; 35-100 kg) to ensure pre-clinically relevant animal and heart (> 300 g) size, while keeping the animals manageable in terms of size and weight.

Sex: We will use pigs of both sexes to reflect the human patient population.

Estimated numbers: Depending on the study's progress, a maximum of 480 animals will be used for the whole study. The estimated numbers for each substudy is shown above.

Substudy 1. Optimizing gene delivery strategies

We will test different gene therapy delivery strategies as described. A regular experiment will comprise 4 groups with n=6 (group size based on previous experience and published studies in related fields of research). Different groups in a single study can relate, e.g., to different vectors, different delivery routes, or different dosages. We will combine experiments in order to use least possible control groups (e.g., saline versus multiple vector injected groups). On average we expect to perform 2 experiments per year, for 5 years we need 240 animals.

Substudy 2. Gene therapy in the context of AV block.

For studies of gene therapy using AV block models, we expect 4 groups per experiment with n=6. Different groups in a single study can relate, e.g., to different transgenes, different vectors, different delivery routes, or different dosages. On average we will perform 2 experiments per year, for 5 years we need 240 animals.

C. Accommodation and care

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

Yes

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

In order to conduct procedures that require anesthesia, fasting (max. 1 day) is indicated. Also, some procedures make single housing for up to 70 days necessary, mainly to prevent nibbling of pen mates on bandages, wounds or catheters, which would result in infections and complications.

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.

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

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

- All experiments, except blood sampling via fixed venous lines (catheters), will be performed when animals are under complete anaesthesia or sedation, according to requirements of the intervention / procedure.
- Adequate peri- and postoperative pain relief will be given, including local analgesia during surgical procedures..
- Animals will be closely monitored by visual inspection and regular weighing postoperatively.
- Animals will be closely monitored for physiological parameters (ECG, blood pressure, breathing, ...) perioperatively.

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

1. Breathing difficulties, reduced mobility and general activity.
2. Inflammatory reactions (e.g., swelling of joints).
3. Redness of puncture or surgical area.
4. Stress (unrest, increased activity)
5. Fatigue, fever

Explain why these effects may emerge.

1. Comprised heart function and arrhythmias, potentially due to AV block, vector delivery and effects of transgene expression and immune response.
2. Immune responses against introduced viruses.
3. Infection of the puncture or surgical wound.
4. Single housing. Waking up and recovery from anaesthesia.
5. Immunomodulation

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

- All procedures will be performed by highly experienced biotechnicians.
- Animals will be monitored closely (e.g., weight) and checked for signs of discomfort.
- Animals will receive appropriate analgesia post-surgery.
- The least severe, yet scientifically appropriate procedure will be chosen, if multiple options are available (e.g., minimally- and non-invasive methods).
- In case of single housing: the presence of other pigs in neighbouring pens with eye and nose contact will reduce stress. The extra attention and extra snacks from the caretakers, when flushing the catheter, will reduce stress induced by single housing.
- In case of recovery from sedation/anaesthesia: limit to once per week. Provide soft mattress during waking up and a calm and undisturbed environment.
- Immunomodulation regimens can be adapted (dosage, compounds) based on observed side effects and measured serum levels.

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

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

When significant arrhythmias are detected, the experiments will be terminated prematurely and the animals are terminated. Our criterion for this is a heart rate of >200 beats per minute for >30 seconds, more than 3 times per 24 hours.

In addition, when two of the following three conditions persist for more than 3 days, the experiments will be terminated prematurely and the animals are terminated:

1. An increased respiratory rate in an unexcited animal of 2x the normal value (36/min) ... **assessed** by visual inspection three times during the same day (morning, noon, evening).

2. A weight loss of more than 15% of the highest measured body weight (or expected weight gain), weighed at the time of surgery, 2 days thereafter, and 2 times a week thereafter.
3. Change in behavior: lethargy or lack of curiosity.

Indicate the likely incidence.

Based on experience, we anticipate that a maximum of 5% of the animals will reach a humane endpoint.

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 | Pacemaker implantation / Telemetry implantation / AV block induction | Moderate |
| 2 | Immunosuppression | Mild |
| 3 | 12-lead ECG and non-invasive electrophysiological studies | Moderate |
| 4 | Invasive electrophysiological studies | Moderate |
| 5 | Systemic delivery of viral vectors | Moderate |
| 6 | Local delivery of viral vectors by surgical open-chest access the heart | Moderate |
| 7 | Local delivery of viral vectors by catheter-based injection to the myocardium (including catheter-based mapping) | Moderate |
| 8 | Non-invasive echocardiography studies | Moderate |
| 9 | Invasive Pressure-Volume Loop measurement | Non-recovery |
| 10 | Blood sampling (sedated) | Moderate |
| 11 | Blood sampling (fixed line) | Moderate |
| 12 | Single housing | Moderate |
| 13 | MRI | Moderate |

| Study | Strain | Sex | Number of animals | Discomfort (cumulative) | Discomfort is caused by a combination of the following procedures (see table above for levels of discomfort for individual procedures) <i>Maximum numbers and frequencies of procedures with relevant discomfort (eg, including sedation or anesthesia) are mentioned</i> |
|-----------------------------|--------------------------|-------|-------------------|-------------------------|--|
| Gene delivery strategies #1 | Landrace / Yorkshire pig | m / f | 36 | moderate | 2, 5 (1x), 8 (2x, 1/wk), 10 (8x, 1/wk) or (11+12), 13 (2x, 1/wk) |

| | | | | | |
|--|--------------------------|-------|---------|--|---|
| Gene delivery strategies #2 | Landrace / Yorkshire pig | m / f | 54 | severe | 2, 6 (1x), 8 (2x, 1/wk), 10 (8x, 1/wk) or (11+12), 13 (2x, 1/wk) |
| Gene delivery strategies #3 | Landrace / Yorkshire pig | m / f | 54 | moderate | 2, 7 (1x), 8 (2x, 1/wk), 10 (8x, 1/wk) or (11+12), 13 (2x, 1/wk) |
| Gene delivery strategies #4 | Landrace / Yorkshire pig | m / f | 96 | severe | 2, 5/6/7 (1x), 8 (2x, 1/wk) or (11+12), 13 (2x, 1/wk) (5 or 6 or 7, based on previous results) |
| Gene therapy in the context of AV block #1 | Landrace / Yorkshire pig | m / f | 60 | moderate | 1 (1x), 2, 3 (11x, 1/wk), 4, 5/7 (1x), 8 (2x, 1/wk), 9 (2x, 1/wk), 10 (11x, 1/wk) or (11+ 12), 13 (2x, 1/wk) (5 or 7, based on previous results) |
| Gene therapy in the context of AV block #2 | Landrace / Yorkshire pig | m / f | 180 | severe | 1 (1x), 2, 3 (11x, 1/wk), 4, 5/6/7 (1x), 8 (2x, 1/wk), 9 (2x, 1/wk), 10 (11x, 1/wk), or (11+12), 13 (2x, 1/wk) (5 or 6 or 7, based on previous results) |
| Added for spontaneous death / mortality | | | 24 [5%] | severe | Peri- and postprocedural complications leading to spontaneous death (non HEP) |
| Total | Landrace / Yorkshire pig | m / f | 504 | Non-recovery 0 % Mild 0 % Moderate 30 % Severe 70 % | |

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 *in vitro* models, such as evaluating the transduction efficiency of the viral vectors and the functionality of the transgenes in cell lines and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. In addition, we perform *in silico* studies to optimize 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 *in vivo* 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: Optimizing the viral vector-mediated gene transfer and the choice of therapeutic genes will first be evaluated *in vitro*. 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. Where possible, minimally-invasive (e.g., catheter-based vs surgical) and non-invasive (e.g., telemetry and pacemaker programmer) procedures will be conducted. Experienced technicians will perform the experiment. Animals will receive pre- and post-operative pain relief and enriched environments (e.g., chewing sticks) and be group housed, when possible. In case of single housing, the presence of other pigs in neighbouring pens with eye and nose contact will reduce stress. The extra attention and extra snacks from the caretakers, when flushing the catheter, will reduce stress induced by single housing. Animals will also be routinely observed to evaluate discomfort. With signs of weakening animals or when significant arrhythmias are detected, the experiments will be terminated prematurely and the animals are terminated.

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.

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'?

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

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.

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.

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.

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.

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

No > Describe the method of killing.

Exsanguation during deep anaesthesia. Then excision of the heart.

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

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

aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
- Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager 12 januari 2023
- Datum
 - Gestelde vraag/vragen
- De DEC heeft verduidelijking gevraagd over:

Project proposal:

1. Background_There's a description of the congenital heart disease CCHB. It is not entirely clear to the DEC why a gene therapy developed in a juvenile animal would be suitable for treatment of the fetus or a newborn? Can you (shortly) elaborate on this?

The manifest pathophysiology in a CCHB fetus/newborn is similar to manifestations as age-related, often co-morbidity-induced AV block. In both cases the conduction from atria to the ventricles is blocked, currently making the implantation of electronic pacemaker critically necessary. This disease condition is simulated by the animal disease model described. Development of potential gene therapy for CCHB patients would be highly relevant, because 1) the implantation of an electronic pacemaker is not possible due to size limitations, and 2) the mentioned epicardial delivery of gene therapy vectors would be the only possible route of delivery and could be conducted in utero using established surgical methods (i.e., for in utero valve surgery).

2. Background_ the DEC misses a description of the vectors that have been tested before in a previous experiment?

We have added further information to the paragraph starting "International research, including own publications ... " on page 3.

3. Feasibility_The DEC wonders whether the number of pigs is a realistic estimation. Is it possible to operate (and house) that 600 pigs in 5 years?

We agree and have reduced the estimation to 504 pigs (480 + 24 [5% mortality]) (see Appendix 1, B).

Appendix 1:

4. Can you indicate clearly the maximal number of times a pig will undergo anesthesia in the maximal scenario (including terminal anesthesia). And the recovery time in between? Please make this consistent in table F and in the NTS.

For Substudy 1, with a maximum follow-up time of 56 days, the maximum number of anesthesia/sedations will be 8 (2x anesthesia for injection and termination on d0 and d56, respectively and 6x sedation for weekly blood sampling and 12-lead ECG, from d7 to d49). The minimum recovery time will be 1 week.

For Substudy 2, with a maximum follow-up time of 70 days, the maximum number of anesthesia/sedations will be 11 (3x anesthesia for AV block, injection and termination on d0, d28 and d70, respectively and 8x sedation for weekly blood sampling and 12-lead ECG,

from d7 to d63). The minimum recovery time will be 1 week.
This has been added to the descriptions of the animal procedures (page 4).

5. *At A_Will gene therapy be applied only once? Please indicate this clearly.*

Gene therapy will only be applied during one intervention, on day 0 for Substudy 1 and on day 28 for Substudy 2, as indicated in Figures 1 and 2. Now also mentioned specifically in the procedure descriptions (point 7).

6. *At A_Immunosuppression_you write: If necessary, immunosuppressants can also be administered via a fixed venous line (see point 13.) Point 13 seems to be missing, but probably point 11 is meant.*

Correct, has been changed accordingly.

7. *At statistics_you write: 'we choose to compare treated vs untreated animals directly within the study group'. What do you mean by this?*

We agree this is misleading. What is meant is that for Substudy 2 we will observe and compare the disease condition (AV block), e.g., by monitoring pacemaker dependency, before and after treatment. This might reduce the need for extensive untreated control groups, but needs to be assessed during the course of the project.

This has been added on page 7.

8. *At B_numbers_ you write 'group size based on previous experience and published studies in related fields of research'. The DEC assumes that you will use your own data and expected effect size to calculate the needed number of animals. Can you elucidate this further?*

We have based the estimate on both published studies in the field and own data. A typical experiment will assess pacemaker dependency as primary endpoint. Own data points at an expected effect size of 10 (pacemaker dependency: control group 95 ± 5 % vs treatment group 85 ± 5 %) and will result in a group size of 6 (alpha 0,05; power 90%) for a sufficiently powered study. We have added text to part B (page 7) to clarify.

9. *Did you include the drop-out in the number of animals needed per group?*

5% drop-out is included in the estimated numbers (part B and F).

10. *You wrote 'We will combine experiments in order to use least possible control groups.' What kind of control groups do you mean?*

Typically, saline injected animals are used in "control groups", as opposed to "treatment group" with functional vectors injected. "Combined experiments" refers to studies including various "treatment groups" which can be controlled by the same saline injected control group. We have added text to part B (page 7).

11. *At HEPs_you defined a number of conditions for a HEP. Can you elucidate whether only one condition is sufficient to apply a HEP, or does it apply after a certain period, or the combination of different conditions?*

This has been specified in part E (page 9): In addition, when two of the following three conditions persist for more than 3 days, the experiments will be terminated prematurely and the animals are terminated.

12. *At HEP_ One HEP is defined as 'An increased respiratory rate in an unexcited animal of 2x the normal value (36/min)'. How will you monitor this outside the operations?*

This has been specified in part E (page 9): An increased respiratory rate in an unexcited animal of 2x the normal value (36/min) ... assessed by visual inspection three times during the same day (morning, noon, evening).

13. *The DEC understands the cumulative discomfort as severe for the indicated combinations. However the DEC rated the individual handlings differently. The DEC considers the open-chest access of the heart as moderate discomfort because sufficient analgesia is possible (in contrast to heart infarct models). Also the single housing is considered to be moderate due to the human attention to the pigs during flushing and the presence of other pigs. Can you give your motivation why you considered this to be severe?*
Our rating of individual discomfort for the open-chest surgery was influenced by the context of additional procedures over the course of an individual study (e.g., involving multiple sedations). **We agree with the DEC's view on individual discomfort for the isolated procedure being "moderate".**

Our rating of individual discomfort for single housing was influenced by previous discussions with individual colleagues, who were favouring this view, even in light of added attention from the caretakers and sight and nose-contact with fellow pigs. But again, we can agree **with the DEC's view on individual discomfort for the isolated procedure being "moderate"**. This has been changed accordingly in part F (page 10 and 11).

14. *Table F_the DEC doesn't have a good picture of the maximal scenario's. Can you indicate the maximal number and frequency of all handlings. (The NTS states 'Tussen de afzonderlijke verdovingen moet een herstelperiode van ten minste een week liggen en in de loop van een experiment van 10 weken mogen niet meer dan 5 verdovingen/anesthesieën plaatsvinden.'* Can this be elucidated in the appendix?

We have added the maximum numbers and frequencies of all handlings with relevant discomfort to table F. Furthermore, we have corrected the NTS to "... niet meer dan 11 verdovingen/anesthesieën plaatsvinden."

15. Why would you consider the combination 2, 7, 8, 10, 12 as severe?

We actually confused procedure 6 (open-chest) and 7 (catheter) in table F. Apologies, now corrected. We consider studies involving open-chest as "severe", as opposed to systemic and catheter-based delivery as "moderate".

16. At F can you add the discomfort for spontaneous death (due to a complication) in the table? Now added.

NTS:

17. At predicted harms_Could you state more clearly what is done in the same surgery/operation? Can you also add that the permanent catheter will lead to individual housing? Additional text has been added.

18. Can you check whether all the information at 'expected impacts on the animals' is also described in the appendix. The DEC reads additional information in the NTS which is not present in the appendix. Additional text has been added to the Appendix 1, part D (page 9).

19. At refinement_it is stated that they will be housed in groups but this is not true for the pigs with a fixed line. Has been corrected.

Addendum:

The DEC noticed that in the appendix at part B_the table, the number of animals doesn't correspond exactly with the number mentioned at F and in the NTS. Could you add the 30 animals in table B as well? (The numbers should be the same everywhere.) Has been corrected accordingly. Now numbers of animals correspond in all instances mentioned.

- Datum antwoord 13 februari 2023
- Verstrek(e) antwoord(en) De antwoorden zijn voor de leesbaarheid direct onder de vragen geplaatst.

De antwoorden hebben wel/~~niet~~ geleid tot aanpassing van de aanvraag
Het voorstel, de bijlage en de NTS zijn aangepast.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
>ja
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / ~~een wijziging op een bestaande vergunning.~~
>ja
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
>ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.
Indien van toepassing, licht toe waarom.
>ja, de voorzitter van de DEC is betrokken als aangewezen dierenarts bij de voorgestelde dierproeven. Hij is daarom uitgesloten van de ethische weging van dit project en het opstellen van het advies.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).
De hoofddoelstelling van **deze aanvraag is concreet omschreven**: "*Het ontwikkelen van klinisch toepasbare, gen-gebaseerde therapieën, als alternatief of als aanvulling op de huidige behandelingen bij AV-block geïnduceerde hartritmestoornissen*".

De volgende onderzoeksdoelen zijn geformuleerd:

1. Het selecteren van potentiële functionele combinaties van de genterapievectoren en transgenen uit *in-vitro* studies, eerder onderzoek of uit de literatuur;
2. Het vaststellen van effectieve en gelokaliseerde transfer van genen in een varkensmodel voor AV-block door de geselecteerde genterapie;

3. Het valideren van een effectieve behandeling van een AV-block door genterapie in pre-klinische modellen en het mogelijk maken van verdere studies om transleerbare procedures te optimaliseren.

De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen is logisch en navolgbaar. Het project lijkt het meeste op voorbeeld 1A uit de handreiking "Invulling definitie project_2022". De drie subdoelen zijn tijds- en uitkomstafhankelijk van elkaar. De eerste doelstelling is gericht op het identificeren van een geschikte combinatie van het transgen en een bijpassende vector uit eerder onderzoek of uit de literatuur. Doelstelling twee is gericht op het op een juiste manier tot expressie laten komen van het gen d.m.v. genterapie. Doelstelling drie is erop gericht of het tot expressie brengen van het gen daadwerkelijk leidt tot een verbetering van de ritmestoornis (AV-block). De DEC vindt dat alle subdoelen bijdragen aan de hoofddoelstelling en samen een project vormen. Het onderzoek is volledig en duidelijk uitgewerkt zodat de mate van ongerief en de dieraantallen duidelijk zijn, waardoor de aanvraag toetsbaar en navolgbaar is.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

n.v.t.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aanvrager heeft de **doelcategorieën 'fundamenteel en translationeel' aangekruist**. In dit project wordt genterapie ontwikkeld voor het verbeteren van AV-block geïnduceerde hartritmestoornissen. Het translationele karakter van dit project is overduidelijk. Er is ook een fundamentele component. De DEC verwacht dat er (ook) fundamentele kennis opgedaan zal worden over de eigenschappen van verschillende vectoren en de onderliggende processen die betrokken zijn bij een succesvolle genterapie op basis van rAAV, met name het succesvol tot expressie brengen van het gen op de juiste plek in het hart.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktischehandreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel (*Het ontwikkelen van klinisch toepasbare, gen-gebaseerde therapieën, als alternatief of als aanvulling op de huidige behandelingen bij AV-block geïnduceerde hartritmestoornissen*) heeft een directe en reële relatie met het uiteindelijke doel (*Het bijdragen aan een betere behandeling van hartritmestoornissen ten gevolge van een AV-block*). De DEC acht het onderzoek, gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld en de onderzoekslijn van deze aanvrager. In de achtergrond is aandacht besteed aan wat er in de voorafgaande vergunning onderzocht is. Er zijn belangrijke ontdekkingen gedaan, die hebben geleid tot de aanname dat zowel structurele als functionele veranderingen een rol spelen in deze afwijkingen. In dit voorstel wordt onderzocht of beide componenten hersteld kunnen worden door genterapie. De DEC oordeelt dat deze vergunning gerechtvaardigd is in de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de

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

Er is een groot verschil in de termijn waarop verschillende belanghebbenden een voordeel of nadeel ervaren. Een langere termijn zorgt voor meer onzekerheid in het **effect op het belang. Het directe belang wordt daarom ingeschat als "belangrijker" en het belang op langere termijn wordt daarom ingeschat als "minder"**. De belanghebbenden die direct in hun morele waarden worden aangetast of bevorderd, zijn in dit fundamentele en translationele project respectievelijk de proefdieren en de onderzoekers. Op (veel) langere termijn wordt het belang van toekomstige patiënten en de medische technologie bedrijven die gentherapie op de markt brengen, bevorderd. Dit onderzoek kan bijdragen aan een betere gentherapie voor hartritmestoornissen. De varkens (n=504) zullen matig (29%; 150/504) tot ernstig (71%; 354/504) ongerief ervaren door dit onderzoek. Met dit onderzoek zullen de onderzoekers meer inzicht verkrijgen in de werking van verschillende vector-gen combinaties om de therapie zo effectief mogelijk te maken. De verkregen inzichten zullen gedeeld worden met het wetenschappelijk veld dat zich bezighoudt met gen- en celtherapie. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties. De patiënten, behandelend artsen en de maatschappij hebben pas op termijn een belang.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?
Nee, de DEC heeft geen aanleiding om te vermoeden dat er schadelijke effecten op het milieu zouden zijn.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).
De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.
De aanvragers zijn zeer ervaren in het bestuderen van de expressie van genen als gevolg van gentherapie via een rAAV en in het ontwikkelen van gentherapie in varkens. De DEC oordeelt op basis hiervan dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen voldoende gewaarborgd zijn.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).
Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. Het onderzoek bestaat uit het optimaliseren van de gentherapie (vector en transgenen), het bestuderen van de verkregen expressie na het toedienen van de gentherapie en het reguleren van de hartritmestoornis door de therapie. DEC denkt dat deze aanpak kan leiden tot het behalen van de directe vraagstelling.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor

voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- X Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I
- richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

De varkens die voor deze aanvraag gefokt worden, zullen gekocht worden van een fokker voor de vleesindustrie. Deze varkens hebben een SPF status en zijn constant in grootte en groei. De DEC heeft geen reden om de twijfelen aan de bruikbaarheid van deze varkens voor de wetenschappelijke doelen of dat er afgeweken zou worden van de WoD. De aanvrager geeft aan dat dit een geregistreerde fokker is.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.
Er wordt afgeweken van bijlage III. De varkens worden individueel gehuisvest na de operatie om te voorkomen dat zij elkaar verwonden. Varkens met een gefixeerde lijn moeten ook individueel gehuisvest worden omdat ze deze lijn niet mogen beschadigen bij elkaar. De varkens hebben wel snuit-snuut contact. De varkens worden ook gevestigd voor de operatie. In de praktijk komt het neer op het missen van het ochtendmaal. Het varken wordt alvast opgehaald zodat het niet ziet dat de andere varkens wel eten krijgen. De avond na de operatie krijgt het varken weer te eten. De DEC vindt deze redenen van dierenwelzijn goorloofd.
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).
Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. Het cumulatieve ongerief wordt als matig tot ernstig ingeschat.
Het ongerief is voor ieder varken ingeschat als minimaal 'matig' door de toediening van de genterapie via een katheter en het plaatsen van de pacemaker tijdens de operatie en een aantal andere handelingen (zoals MRI, bloedafnames, immunosuppressieve middelen, en wekelijks verdoven voor hartfunctiebepalingen). Het ongerief kan ernstig worden als er een open-thorax operatie nodig is voor het plaatsen van de genterapie. De DEC is het eens met deze inschatting van het ongerief. De aanvrager schatte het individueel huisvesten van de varkens gedurende de hele proef (wanneer er een gefixeerde lijn wordt geplaatst voor bloedafname) ook in als ernstig ongerief. De DEC is het eens dat het cumulatief ongerief ernstig is maar schat het individueel huisvesten in als maximaal matig ongerief. De mogelijkheid tot snuit-snuut contact en de verhoogde aandacht van de verzorgers dragen bij aan een verlaging van de stress door het alleen huisvesten. In minder dan 5% kan het bovendien voorkomen dat varkens door complicaties na de operatie (zoals dodelijke ritmestoornissen) 's nachts spontaan

overlijden. De EU-richtlijn geeft aan dat het ongerief dan ook ingeschat moet worden als ernstig. Het varken is deels afhankelijk van de pacemaker maar zal hier niet veel van merken. Het hebben van hartritmestoornissen zal geen ongerief geven. Het ongerief ontstaat vooral tijdens het herstel na de operatie, en de herhaalde verdovingen (één keer per week). De DEC weegt in het ongerief door het alleen huisvesten in combinatie met de andere handelingen mee dat de dieren extra aandacht (voer) krijgen van de verzorgers doordat de vaste lijn vaak doorgespoeld moet worden en dat er wel snuit-snuitcontact mogelijk is.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).
De fysieke integriteit wordt op verschillende wijzen aangetast door de behandelingen die de varkens ondergaan. De operatie aan het hart en het afnemen van bloed tasten de integriteit aan.
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
De HEPs zijn afgestemd op de proeven die de dieren ondergaan. Mochten er hartritmestoornissen ontwikkelen waarbij het hart vaker dan 200 bpm slaat voor langer dan 30 seconden en meer dan 3x per 24 uur, zal een HEP worden toegepast. Ook als er gewichtsverlies van meer dan 15% is en/of de ademfrequentie verdubbeld is en/of als het dier niet meer nieuwsgierig of lethargisch is. De aanvrager geeft aan dat twee van de drie condities aanwezig moet zijn en dat de conditie voor 3 dagen aanwezig moet zijn. De DEC heeft er begrip voor dat een varken niet te snel gedood moet worden, en vindt een periode van drie dagen acceptabel. De DEC verwacht dat deze HEPs borgen dat varkens met een onverwachte slechte hartfunctie na de operatie uit de proef worden gehaald en dat op deze wijze verder ongerief voorkomen kan worden.
Het percentage dat de HEP bereikt is ingeschat op <5%. De DEC heeft geen reden om te twijfelen aan dit percentage gezien de ervaring met deze ingrepen in het varken.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
De aanvrager legt uit dat voordat vectoren in het varken onderzocht zullen worden, er uitgebreid in vitro onderzocht is of de vectoren technisch in staat zijn om de juiste cellen te transduceren. Ook worden computermodellen gebruikt om in te schatten welke (trans-)genen het meest succesvol zouden kunnen zijn. Ondanks alle vooruitgang in deze methoden is het onderzoeken van hartritmestoornissen en de mogelijke behandeling daarvan nog nodig in varkens. De DEC vindt het voldoende aannemelijk dat het onderzoeken van een gentherapie om een AV-block te herstellen en daarmee de hartritmestoornissen kan verminderen niet in een proefdiervrij model getest kan worden. De DEC vindt het voldoende onderbouwd dat er voldoende voorwerk in alternatieve methoden gedaan zal worden voordat vervolgonderzoek in een proefdiermodel gedaan zal worden. De DEC vindt het voldoende aannemelijk dat de complexiteit het noodzakelijk maakt dat er een proefdiermodel gebruikt moet worden.
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
De berekening van het aantal dieren per groep en de aantal groepen per

experiment is geschat op basis van ervaring en eerder berekende poweranalyses. Per onderdeel van de studie is ingeschat hoeveel dieren waarvoor gebruikt gaan worden. De exacte powerberekeningen zullen bij ieder experiment op werkprotocol niveau gedaan worden. De rekensom voor het totaal aantal dieren is navolgbaar en lijkt realistisch ingeschat te zijn.

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

De DEC vindt dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning van dierproeven en dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd omdat:

- 1) de onderzoekers over voldoende kennis en kunde bezitten om de proeven optimaal uit te voeren;
- 2) de HEPs bijdragen aan het voorkomen van extra ongerief;
- 3) de varkens geen last hebben van de hartritmestoornissen;
- 4) de varkens naar verwachting goed zullen herstellen van de operatie.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

Er zal in dit onderzoek gebruik gemaakt worden van zowel vrouwelijke als mannelijke varkens.

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

Alle varkens worden in het kader van het onderzoek gedood.

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

N.v.t.

NTS

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

Ja, de NTS is een evenwichtige weergave van het project.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).
Rechtvaardigt het onderzoeksdoel ("*Het ontwikkelen van klinisch toepasbare, gen-gebaseerde therapieën, als alternatief of als aanvulling op de huidige behandelingen bij AV-block geïnduceerde hartritmestoornissen*"), het gebruik van 504 varkens die maximaal matig (29%) tot ernstig (71%) ongerief kunnen ervaren door dit onderzoek?

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

De belangrijkste belanghebbenden op korte termijn in dit fundamentele en translationele project zijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op de langere termijn bestaan de belanghebbenden uit de toekomstige patiënten, hun behandelend artsen die met gentherapie geholpen kunnen worden en de maatschappij.

De dieren worden direct door dit onderzoek geschaad zoals beschreven onder punt 11 en 12. De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties.

Op langere termijn draagt deze kennis bij aan het ontwikkelen van betere gentherapieën. Dit type behandeling heeft zeer grote voordelen doordat het de oorzaak van een ziekte kan wegnemen in plaats van het bestrijden van (alleen) de symptomen. Hoewel maximaal 504 varkens gebruikt zullen worden voor dit onderzoek, die maximaal matig (29%) tot ernstig (71%) ongerief zullen ervaren, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte nuttige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier aan bijdragen. De DEC waardeert de vermeerdering in inzicht in de toepassing van gentherapie voor hartritmestoornissen, als de meest zwaarwegende waarde die tegen het gebruik en het ongerief van maximaal 504 varkens opweegt.

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

Gentherapie voor de behandeling van ernstige hartritmestoornissen

De DEC is van mening dat het onderzoek met het **doel** "*Het ontwikkelen van klinisch toepasbare, gen-gebaseerde therapieën, als alternatief of als aanvulling op de huidige behandelingen bij AV-block geïnduceerde hartritmestoornissen*", het gebruik van maximaal 504 varkens, die maximaal matig (29%) tot ernstig (71%) ongerief kunnen ondergaan door dit onderzoek, rechtvaardigt.

Het doel van dit project is om een betere genterapie te ontwikkelen voor de behandeling van een AV-blok geïnduceerde hartritmestoornis. Het achterliggende idee is dat zowel het structurele herstel als het functionele herstel noodzakelijk is om de geleiding van het hart te kunnen herstellen. De DEC acht het aannemelijk dat de doelstellingen binnen de kaders van het project behaald kunnen worden. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. Het beantwoorden van deze onderzoeksvragen kan niet in een proefdiervrij alternatief (zie vraag C14).

De DEC schat in dat dit project zal bijdragen aan het ontwikkelen van betere genterapie, voor hartritmestoornissen maar ook voor andere ziekten. In dit voorstel wordt onderzoek gedaan naar de beste combinatie van het type vector en het transgen. Alleen zo komt het meest effectieve gen tot expressie op de benodigde plek in het hart. Het ernstige ongerief is uitgebreid besproken in de DEC vergadering. Het ernstige ongerief in deze proeven wordt veroorzaakt door de open-thorax operatie en/of het individueel huisvesten. Een open-thorax operatie is pijnlijk voor de varkens omdat het sternum daarna moet herstellen terwijl er veel gewicht op moet steunen. De DEC vindt dat er omstandigheden zijn die het ongerief door de individuele huisvesting verfijnen. Er is extra aandacht van de verzorgers bij het regelmatig doorspoelen van de vaste lijn en varkens worden zodanig gehuisvest dat ze andere varkens kunnen zien, horen, ruiken en er is snuit-snuitcontact mogelijk. Het ongerief wordt verder ook veroorzaakt door het herhaald onder verdoving gaan voor de hartfunctietesten. De keuze van de HEPs voorkomt ook ongerief (zie vraag 13).

De DEC vindt het gerechtvaardigd om onderzoek te doen naar verbeteringen van genterapieën tegen hartritmestoornissen. De DEC vindt het uiteindelijke belang voor de patiënt en de vermeerdering van de wetenschappelijke kennis opwegen tegen het gebruik van en het ongerief dat de varkens zullen ondergaan.

De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door het gebruik van powerberekeningen. Dit onderzoek maakt geen gebruik van dieren met een speciale herkomst. Ook is er geen speciale wet- en regelgeving van toepassing op dit project.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

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 kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een

meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).
Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

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

Bijlage I: Voorbeelden

De in deze bijlage weergegeven voorbeelden zijn alleen bedoeld om een indicatie te geven van het gewenste antwoord en dienen niet letterlijk overgenomen te worden.

A. Algemene gegevens over de procedure

A7. Voorbeeld: "De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD."

C. Beoordeling (inhoud)

C1. Maak gebruik van de **handreiking 'Invulling definitie project'** om te bepalen of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Overleg de argumenten waarom dit wel of niet het geval is. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Voorbeeld: "**Deze** aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende **samenhang heeft.**"

C4. Voorbeeld: "Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzichten in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden die bijdrage aan het herstel van bot na trauma. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project geen reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC

acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. De DEC is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van kennis over botontwikkeling, gerechtvaardigd is binnen de context van het **onderzoeksveld.**”

C5. Voorbeeld: “De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een therapie voor de ernstige ziekte X zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënt.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoeker zullen kennis verkrijgen. Ook zal de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en patenten.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd **worden.**”

C9. Het uitgangspunt is dat deze categorieën van dieren, omstandigheden of handelingen niet in dierproeven worden gebruikt. Hier kan alleen van af worden geweken indien er wetenschappelijk is onderbouwd waarom het doel van het project niet kan worden bereikt dan door gebruikmaking van de desbetreffende dieren. Daarnaast gelden er voor elk van de genoemde categorieën specifieke beperkende voorwaarden.

Voorbeeld A: “Er worden dieren uit het wild gebruikt. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd waarom het noodzakelijk is wilde dieren te gebruiken De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden met dieren die speciaal voor onderzoek worden gefokt. De DEC is er verder van overtuigd dat het vangen van de dieren door deskundige personen zal gebeuren waardoor de kans op pijn en lijden beperkt zal worden. Ook is er een dierenarts beschikbaar om de dieren te onderzoeken/behandelen mocht tijdens of na het vangen blijken dat de dieren een slechte gezondheid hebben of gewond zijn **geraakt.”**

Voorbeeld B: “Er wordt een dodingsmethode gebruikt die niet beschreven staat in bijlage IV van de richtlijn. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden indien een in de bijlage IV beschreven methode gebruikt wordt en het dus noodzakelijk is om een alternatieve methode te gebruiken. De DEC is van mening dat de beschreven alternatieve methode, te weten ... , een acceptabel alternatief is, omdat.... ”

C12.Voorbeeld: “De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch te veranderen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid en zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Hierdoor zullen de dieren geen natuurlijk **gedrag kunnen vertonen.”**

C18.Voorbeeld: “De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft aan dit in het verleden altijd zo te hebben gedaan en wil dit graag op deze wijze voorzetten. De DEC is van mening dat de aanvrager niet in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager niet kunnen aantonen dat het uitvoeren van het project met

zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een dermate grote variatie dat er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

D. Ethische afweging

D2. Voorbeeld A: **"Project** gericht op ontwikkeling van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte:

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

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.

Waarden die voor de doelgroep (de samenleving) bevorderd worden: veel voordeel

De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de proefdieren. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit leiden tot de ontwikkeling van een vaccin tegen een tot dusverre onbehandelbare ernstige, besmettelijke ziekte waar een grote groep mensen aan lijdt. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken worden dieren gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt **blijft."**

Voorbeeld B: "Project gericht op het ontwikkelen van een therapie tegen een ziekte waar al veel behandelingsmogelijkheden voor zijn.

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

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: weinig voordeel

De DEC is van mening dat de belangen van de proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de patiënten. De DEC is van mening dat het om een ziekte gaat waar al goede behandelingsmogelijkheden voor zijn, de verwachte winst door een nieuwe behandeling zeer beperkt is en de kans dat de doelstellingen behaald worden zeer klein is. Daartegenover staat het ernstige ongerief dat de dieren zullen **ondergaan."**

D3. Voorbeeld (Zie D2 voorbeeld A): **"De DEC is overtuigd van het belang van de** doelstellingen: het ontwikkelen van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie dieren, dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat het voor het eerst ontwikkelen van een vaccin tegen ziekte X met als uiteindelijk doel het uitbannen van deze ziekte wereldwijd op de wijze zoals beschreven in dit project het gebruik van proefdieren **rechtvaardigt."**

E. Advies

E2. Voorbeeld: **"Het** advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Twee van de

DEC leden zouden tot een negatief advies komen. Deze leden zijn van mening dat voor dit project de waarden van de proefdieren die in het geding zijn zwaarder wegen dan de waarden van de doelgroep die bevorderd zullen worden. De redenen hiervoor zijn.....”



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Postbus 22600 Sorgsupport, E2-218

1100 DD AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD11800202316683

Bijlagen

3

Datum 3 april 2023

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 6 januari 2023 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Translatable gene therapy approaches to treat complete AV block" met aanvraagnummer AVD11800202316683. 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 3 april 2023 tot en met 14 februari 2028.

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

Beoordeling achteraf

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

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

Procedure

Datum:

3 april 2023

Aanvraagnummer:

AVD11800202316683

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC-AMC (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 7 maart 2023. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 9 maart 2023 en 31 maart 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de genoemde doelcategorieën en het format van de NTS en het benoemen van de individuele huisvesting van de dieren in de bijlage dierproeven. In een tweede vragenronde bent u gevraagd om het diermodel verder te onderbouwen in de bijlage dierproeven. In een tweede vragenronde bent u gevraagd het gekozen diermodel verder te onderbouwen. 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 februari 2029 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen

bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

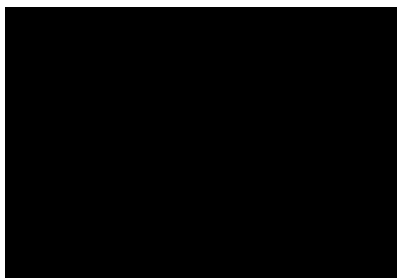
Datum:
3 april 2023
Aanvraagnummer:
AVD11800202316683

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: Academisch Medisch Centrum

Adres: Postbus 22600

Postcode en plaats: 1100 DD AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 april 2023 tot en met 14 februari 2028, voor het project "Translatable gene therapy approaches to treat complete AV block" met aanvraagnummer AVD11800202316683, na advies van dierexperimentencommissie DEC-AMC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Principle Investigator/Onderzoeker. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 6 januari 2023
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 7 maart 2023;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Investigation and development of gene therapy for AV block using porcine models, zoals ontvangen op 3 april 2023;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 15 maart 2023;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 7 maart 2023
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 15 maart 2023, 3 april 2023.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ongerief |
|--|--|---------------|------------------------------|
| 3.4.3.1 Investigation and development of gene therapy for AV block using porcine models | | | |
| | Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>) / Landrace / Yorkshire pig | 504 | 70,0% Ernstig 30,0% Matig |

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

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

Geldende voorschriften

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

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

Aanvraagnummer: AVD11800202316683

- 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:

AVD11800202316683

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:
AVD11800202316683

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.