

Inventaris Wob-verzoek W16-04s									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS 20151222</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Beschikking en vergunning				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	DEC-advies				x		x	x	
5	Projectvoorstel				x		x	x	
6	bijlage dierproef 1				x		x	x	
7	bijlage dierproef 2				x		x	x	
8	bijlage bij aanvraag				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x		
10	CCD advies		x						x

21 AUG 2015



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	3 4 3 3 6 2 7 7 7
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Meibergdreef 31
		Postbus	
		Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam
		IBAN	NL68RABO0136166741
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741	Lege
<input type="checkbox"/> Wijziging €	Lege
<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso	
<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur	

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen, indien van toepassing
<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
<input checked="" type="checkbox"/> Bijlage 1 (Figuren) en Appendix 3.4.4.1 en 3.4.4.2




## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	
Plaats	Amsterdam
Datum	18 - 08 - 2015
Handtekening	

**Procedure van betaling AMC**

Factuur sturen aan:

AMC crediteurenadministratie

Postbus 400

1115 ZJ Duivendrecht

**Onder vermelding van:**

Kostenplaatsnummer **7510**



<b>Gegevens ten behoeve voor het beoordelen van de projectvergunningaanvraag door de Centrale Commissie Dierproeven</b>	
Naam instelling	ACADEMISCH MEDISCH CENTRUM
Afkorting instelling	AMC
Deelnemer nummer NVWA	11800
Titel en naam contactpersoon	[REDACTED]
Toevoegingen (Kamernr.)	[REDACTED]
Correspondentie adres	MEIBERGDREEF 31
Correspondentie postcode	1105 AZ
Correspondentie woonplaats	AMSTERDAM
Bezoekadres	IDEM
Postcode	IDEM



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum Amsterdam  
t.a.v. [REDACTED]  
Meibergdreef 31  
1105 AZ Amsterdam

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
AVD118002015222

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
1

Datum 24 september 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 18 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project [REDACTED] met aanvraagnummer AVD118002015222. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project 'Protease-activated receptor 1 in pancreatic cancer' starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 september 2015 tot en met 30 augustus 2020.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

**Bezwaar**

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

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

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

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

**Datum**  
24 september 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD118002015222

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

- Hiervan deel uitmakend: - DEC-advies  
- Weergave wet- en regelgeving



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academisch Medisch Centrum Amsterdam  
Adres: Meibergdreef 31  
Postcode en woonplaats: 1105 AZ Amsterdam  
Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 september 2015 tot en met 30 augustus 2020, voor het project [REDACTED] met aanvraagnummer AVD118002015222, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-AMC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 augustus 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 augustus 2015 en aangepaste Niet-technische Samenvatting, zoals ontvangen bij digitale indiening op 23 september 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 18 augustus 2015

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Orthotopic pancreatic cancer model	Muizen	1300	Matig
Subcutaneous pancreatic cancer model	Muizen	180	Matig

### Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

-De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten voor aanvang van het project worden vastgesteld en dat de IvD instemt met de vastgestelde criteria.

-In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.



## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **Einde van een dierproef**

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

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

Uit artikel 13c 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 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.



# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
2. Titel van het project: [REDACTED]
3. Titel van de NTS:                Betere chemotherapie bij alvleesklierkanker
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC:                                DEC-AMC
  - telefoonnummer contactpersoon:   020-5666479
  - mailadres contactpersoon:           dec@amc.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken             04-06-2015
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD                             13-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

#### 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum
- Strekking van de vraag / vragen
- Datum antwoord
- Strekking van het (de) antwoord(en)
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)

Ja

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren

Ja

4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering

Nee

## **C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:

uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is/zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en)

> Het doel is basaal wetenschappelijk en translationeel onderzoek, als in de wet genoemd.

3. Is het project in overeenstemming met geldende wet en regelgeving?

> Ja

4. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een deels essentieel, deels substantieel belang.

> meningen van DEC-leden variëren tussen substantieel en essentieel; het belang van de hoofddoelstelling voor zover deze het ophelderen van de vermoedelijke mechanismen betreft waarmee [ ] drug resistentie veroorzaakt, wordt ingeschat als essentieel. Het belang van de doelstelling om het mogelijk belang van [ ] in (de behandeling van) pancreaskanker vast te stellen (of kortweg: om te komen tot een betere behandeling van pancreaskanker) wordt als substantieel ingeschat, vanwege de relatief grote afstand die nog bestaat tussen dit fundamentele onderzoek en toepassing van de resultaten ervan in de kliniek.

Een opmerking van de DEC-AMC naar aanleiding van deze vraag: de vier gradaties van de mate van belang die in de vraagstelling worden genoemd, zijn in het geheel niet nader omschreven. Het wordt kennelijk geheel aan het persoonlijk gevoel van de individuele DEC-leden en aan de discussie in de vergadering overgelaten om betekenis aan deze termen toe te kennen. Dit wordt onwenselijk geacht. Een handreiking van de CCD hierbij, met enkele voorbeelden, zou de discussies hierover in de vergadering kunnen bekorten, en ook bijdragen aan nationale harmonisatie.

5. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

> Omdat het *uiteindelijke* doel nogal ver weg wordt gelegd, waarbij de onderzoeker ervan uitgaat dat de mechanismen die hij mogelijk in een bepaalde muizenstam zal kunnen ontrafelen, ook in de mens aanwezig zullen zijn, is de kans dat dit uiteindelijke doel reeds bij afronding van dit project zal zijn bereikt, niet groot. De drie vraagstellingen (of "directe doelen") die onderwerp zijn van studie binnen dit project, zullen hoogstwaarschijnlijk met de voorgestelde strategie en experimentele aanpak kunnen worden beantwoord (behaald).

6. Zijn kennis en kunde van onderzoekers en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd?

> Ja, de onderzoeker heeft ervaring met het model en met de beschreven handelingen bij muizen. De aanvrager en medewerkers hebben ervaring met het model.

7. Wat is het effect van onderzoek op het welzijn van mens, dier en omgeving en wetenschappelijke kennis?

> Mogelijkheid voor het vinden van een effectievere behandeling van pancreaskanker, door het bestrijden van drug resistentie, en kennisvermeerdering in fundamentele mechanismen die mogelijk ook bij andere resistente tumoren de behandeling verstoren. Deze studies hebben geen negatief effect op het welzijn van de mens of van het dier, of de omgeving.

8. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categoriën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.

> Geen bijzonderheden

9. De kwaliteit van de huisvesting en verzorging is wel/niet volgens bijlage III van de richtlijn en wordt geborgd door....

> Voldoet aan bijlage III; geborgd door de IvD

10. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd

> Het ongerief wordt ook door de DEC ingeschat als matig. Bij een zeer gering aantal dieren (<5%) zou korte tijd ernstig ongerief kunnen ontstaan ten gevolge van complicaties, maar door toepassing van scherp gedefinieerde humane eindpunten zal dit tot een minimum beperkt blijven.

11. De onderzoekers hebben de volgende alternatieven voorgesteld. Deze kunnen de voorgestelde dierproeven wel/niet geheel/gedeeltelijk vervangen

> Binnen het project worden in vitro en ex vivo experimenten gedaan, maar deze kunnen niet expliciet als "alternatief" worden aangemerkt, omdat ze nu eenmaal de best geëigende methode vormen voor het beantwoorden van de desbetreffende vraagstellingen. Zij komen niet in de plaats van dierproeven.

12. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan het vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

> Het maximum aantal dieren dat binnen dit project zal worden gebruikt, moet hier worden aangegeven, en het spreekt vanzelf dat het opgegeven aantal enige onderbouwing behoeft. Aantallen dieren per groep, aantal groepen per soort experiment, aantal experimenten en eventuele herhalingen per specifieke vraagstelling, verwachte uitval, etc. kunnen allemaal van tevoren worden ingeschat, om tot een inschatting van het totaal aantal benodigde dieren te komen. De onderzoeker heeft dat alles naar behoren en zorgvuldig gedaan, en geeft ook aan dat voortdurend zal worden bekeken aan de hand van de feitelijke spreiding binnen reeds uitgevoerde experimenten, of voor volgende experimenten de groeps grootte niet naar beneden kan worden bijgesteld. Voor te verwachten uitval (<5%) is geen compensatoir aantal dieren opgenomen in de schatting van het totale gebruik.

Een pva dient ook voldoende informatie te bevatten over de methodologische en statistische aanpak, die door de DEC zal worden betrokken in haar beoordeling en afweging. Vermindering van het aantal te gebruiken dieren door gebruik van de juiste methoden en technieken kan hier slechts globaal worden ingeschat. De door de onderzoeker te volgen strategie, zoals de volgorde waarin

onderdelen van het project worden uitgevoerd (waarbij verkregen resultaten van het ene experiment de invulling van het volgende kunnen bepalen), kan een verdere significante invloed hebben op het totaal aantal te gebruiken dieren. Hoewel deze volgorde niet tot in detail is uitgewerkt, zijn er voldoende aanwijzingen dat de onderzoeker zich hiervan bewust is, en waar mogelijk, de meest dierbesparende strategie zal volgen.

Wanneer de werkprotocollen behorende bij de afzonderlijke dierproeven bij de IvD zullen worden ingediend zal de onderzoeker veel nauwkeuriger kunnen aangeven welke mogelijkheden voor vermindering er zijn, en welke maatregelen hij zal nemen om het aantal te gebruiken dieren zoveel mogelijk te verminderen. In dat stadium zal het werkprotocol ook ter toetsing aan een statisticus worden voorgelegd.

13. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

> Uit de elementen genoemd in de beschrijving van de dierproeven onder D kan worden afgeleid dat de onderzoeker goed op de hoogte is van regelgeving, richtlijnen, en onder deskundigen heersende meningen met betrekking tot welzijnsaspecten, en dat alles is gedaan om de proeven zoveel mogelijk te verfijnen.

In dit stadium, en op het abstracte niveau van een pva, zijn moeilijk alle details van middelen en maatregelen van verfijning aan te geven. In de werkprotocollen kunnen per experiment de specifieke verfijningsmaatregelen worden aangegeven die zullen worden gebruikt. De IvD heeft de expertise om dit op detailniveau te beoordelen, en zal ook toezien op de feitelijke uitvoering ervan.

14. Worden de belangen van consumenten, burgers, dieren en omgeving voldoende beschermd?

> Ja, door de experimenten uit te voeren onder DM2 regime wordt de omgeving voldoende beschermd. De belangen van consumenten, burgers en dieren (in de natuur of aan de zorg van mensen toevertrouwd, niet de proefdieren in dit experiment worden hier bedoeld) komen door dit experiment in het geheel niet in gevaar, en hoeven dus niet te worden beschermd.

15. Worden dieren in voorraad gedood in het kader van het project of na afloop van het project? Kan dit voorkomen worden?

> Ja, door de experimenten uit te voeren onder DM2 regime wordt de omgeving voldoende beschermd. De belangen van consumenten, burgers en dieren (in de natuur of aan de zorg van mensen toevertrouwd, niet de proefdieren in dit experiment worden hier bedoeld) komen door dit experiment in het geheel niet in gevaar, en hoeven dus niet te worden beschermd.

## D. Ethische afweging

De DEC acht het wetenschappelijk belang van deze studie groot: het onderzoek leidt zeer waarschijnlijk tot het ophelderen van de mechanismen waarmee PAR1-afhankelijke drugresistentie wordt veroorzaakt. Dit inzicht in de PAR1-afhankelijke drugresistentie zal mogelijk bij kunnen dragen aan een effectievere behandeling van pancreaskanker. Dit maatschappelijk belang weegt de DEC mee, ook al is de weg naar de behandelkamer nog lang.

De DEC is van mening dat in deze studie tegemoet wordt gekomen aan de 3 V's:

- Deze studie wordt deels uitgevoerd met in-vitro en ex-vivo experimenten. Deze kunnen echter niet volledig de dierproeven *vervangen*.
- Het aantal te gebruiken proefdieren is door gebruik te maken van de juiste methoden en technieken door de onderzoeker ingeschat op 1500. De DEC acht deze globale inschatting voor de gehele studie als zorgvuldig. De onderzoeker geeft tevens aan dat er tijdens het onderzoek zal worden bekeken of de groepsgrootte naar beneden kan worden bijgesteld. De onderzoeker zal hierin samenwerken met een statisticus en de IVD. Hiermee wordt tegemoet gekomen aan de eis van *vermindering*.
- Uit de elementen genoemd in de beschrijving van de dierproeven leidt de DEC af dat de onderzoeker goed op de hoogte is van regelgeving, richtlijnen, en onder deskundigen heersende meningen met betrekking tot welzijnsaspecten. De DEC erkent de *verfijnings*methoden van de onderzoeker om het leed bij de proefdieren zo veel mogelijk te beperken.
- De DEC schat het ongerief van de muizen in als matig. Er is een kleine kans op ernstig ongerief door complicaties, die tot een minimum beperkt zal worden door toepassing van de geformuleerde humane eindpunten.

In de afweging van de DEC is meegenomen dat pancreaskanker alleen al in Nederland jaarlijks bij 2200 mensen wordt vastgesteld, waarbij de kans om 5 jaar na diagnose nog in leven te zijn 5% is.

Deze studie geeft inzichten over de PAR1-afhankelijke drugresistentie (wetenschappelijk belang) en zal door die inzichten op termijn een bijdrage leveren aan een betere behandeling van pancreaskanker bij mensen (maatschappelijk belang). Door deze voordelen voor de wetenschap en de mogelijke verbeteringen voor het welzijn van de mens vindt de DEC het voorgestelde gebruik van de proefdieren en de wijze waarop zij in hun welzijn worden aangetast te rechtvaardigen.



## **E. Advies**

1. De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Dit advies is gebaseerd op een unaniem standpunt van de DEC. Nadat was vastgesteld dat er aan de voorwaarden is voldaan van deugdelijk wetenschappelijk onderzoek en er rekening is gehouden met de 3 V's zijn in de afweging de volgende factoren van doorslaggevend belang geweest: het wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek versus de mate van ongerief bij de proefdieren.  
Deze studie geeft inzichten over de PAR1-afhankelijke drugresistentie (wetenschappelijk belang). Die inzichten kunnen op termijn mogelijk een bijdrage leveren aan een betere behandeling van pancreaskanker bij mensen (maatschappelijk belang). De DEC vindt het te rechtvaardigen dat voor deze voordelen voor de wetenschap en de mogelijke verbeteringen voor het welzijn van pancreaskankerpatiënten 1500 muizen worden gebruikt en in hun welzijn worden aangetast (matig ongerief).



## Form

### Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website ([www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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 health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

Pancreatic cancer is a **devastating disease** with the worst survival outcome of any human cancer. The incidence, which is around 10 per 100,000 individuals, is rising in developed countries, with around 44 thousand new cases and 37 thousand deaths in the United States in 2011. The overall 5-year survival rate is less than 5%, and overall mortality approaches 99%. Only in around 20% of patients, surgical resection is a possible, which is associated with improved 5-year survival rates of 15–20%. However, the vast majority of this limited group of eligible patients eventually die because of metastatic disease.

Progress in improving survival of pancreatic cancer patients has been slow, and current treatment options are severely inadequate. The only significant progress has been a slight prolongation and improved quality of life in patients with unresectable disease by chemotherapeutic agents. In the Netherlands, gemcitabine is first-line standard of care for inoperable pancreatic cancer although the observed benefits are small and seem restricted to patients with a relatively good health. Recent combination therapies with different chemotherapeutic agents, like FOLFIRINOX or gemcitabine/nab-paclitaxel, seem to be superior over single-drug regimens but even in the specific group of patients eligible for this treatment, the survival benefit is limited. To increase survival of pancreatic cancer patients, it is pivotal to understand why chemotherapy is so ineffective in pancreatic cancer and to identify novel targets to improve the effectivity of chemotherapy.

is suggested to be expressed on cancer cells (both human and mouse) and to induce their proliferation. Interestingly however, is mainly expressed on cells surrounding the actual tumor cells in pancreatic cancer patients ( This may be particularly important as the compartment is one of the most characteristic hallmarks of pancreatic cancer that is actively involved in tumor growth and drug resistance. Indeed, pancreatic cancer cells release various factors that stimulate cells (mainly fibroblasts, macrophages and endothelial cells). cells, in turn, release mitogenic substances that stimulate tumor growth, invasion, and resistance to therapy.

To assess the potential relevance of expression in the compartment of pancreatic cancers, we recently analysed the efficacy of chemotherapy on the growth of wild type pancreatic cancer cells in wild type . Intriguingly, dramatically potentiated the efficacy of chemotherapy in this murine pancreatic cancer model ( ). All chemotherapy treated wild type mice showed large tumors at sacrifice, whereas no tumors were observed in % of gemcitabine treated mice. In the remaining tumor size was reduced about 25-fold as compared to wild type mice treated with gemcitabine. Our data thus identify expression in the as a key component in drug resistance of pancreatic cancer. The underlying mechanism by which modifies drug resistance of pancreatic cancer remain elusive however and in the current project we aim to elucidate the mechanism using different in vitro, ex vivo and murine models.

### 3.2 Purpose

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

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

The overall aim of the current project is to elucidate the mechanism by which ██████ modifies drug resistance and to determine the potential relevance of ██████ in pancreatic cancer. To this end, we aim to address three objectives:

**1. Determining whether macrophages are the ██████ responsible for ██████ (drug resistance in) pancreatic cancer** – Macrophages were long thought to “attack” tumor cells and thus to diminish tumor growth and to induce drug sensitivity. More recent data show however that tumour-associated macrophages are important drivers of pancreatic cancer progression and drug resistance (Tang, et al. Immunology 138:93-104, 2013). Consequently, we hypothesize that macrophages are the ██████ cells that drive ██████ drug resistance. In line with this hypothesis, we recently showed that 1) macrophage numbers are reduced in ██████ pancreatic ██████, 2) ██████ potentiates macrophage migration towards tumor cells in vitro and 3) ██████. In the current project, we aim to prove or refute the importance of macrophages in ██████ drug resistance in an *in vivo* setting.

**2. Elucidation of the ██████ in the setting of pancreatic cancer** – ██████, etc). The fact that ██████ inhibition only marginally improves overall survival of pancreatic cancer patients suggest that ██████ is not the ██████ in the setting of pancreatic cancer. In line with this notion, we recently showed that ██████ ion did not mimic ██████ in the ██████ pancreatic cancer model (██████). Consequently, we aim to identify (and characterise) the ██████ in pancreatic cancer subsequently leading to drug resistance in the ██████ pancreatic cancer model.

**3. Establishing whether ██████ (drug resistance in) pancreatic cancer is a general mechanism** – The experiments leading up to this proposal showed that genetic ablation of ██████ from the host compartment (██████) pancreatic cancer metastasis and potentiated gemcitabine sensitivity. Importantly however, these experiments have been performed using a single ██████ pancreatic cancer model in combination with a single chemotherapeutic drug. As a first step towards assessing the potential clinical relevance of ██████ inhibition in pancreatic cancer, it is however pivotal to validate our findings in alternative pancreatic cancer models using alternative chemotherapeutic drugs.

### 3.3 Relevance

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

Overall, the project will significantly contribute to the understanding of underlying mechanisms leading to drug resistance in pancreatic cancer. In detail:

**Ad objective 1** - We will obtain mechanistic insight whether macrophages present in the pancreatic cancer ██████ affect chemotherapy response in pancreatic cancer. In addition to its scientific importance (identifying a key cell type in drug resistance), it may guide future experiments aiming at a full understanding of drug resistance in cancer which may ultimately benefit patients.

**Ad objective 2** - We will identify the ██████ driving chemotherapy resistance in the ██████ pancreatic cancer model. The

identification of this [REDACTED] protease may be very relevant as it allows the specific targeting of the "[REDACTED]" pancreatic cancer pathway without targeting all [REDACTED]. Such a treatment strategy would obviously be more safe as compared to strategies targeting [REDACTED]. This latter point is emphasized by the fact that [REDACTED] lead to [REDACTED] due to the inhibition of [REDACTED] signalling on [REDACTED]. Targeting the e [REDACTED] [REDACTED] protease relevant for pancreatic cancer will however not induce [REDACTED] [REDACTED] is not affected.

**Ad objective 3** - We will establish whether targeting [REDACTED] affects drug resistance in a more general fashion. Determining whether [REDACTED] also induces drug resistance in alternative models, using alternative chemotherapeutics that are used in the clinics, should identify [REDACTED] as a general modifier of drug resistance in pancreatic cancer. If so, [REDACTED] ([REDACTED] inhibitors may be considered for clinical research.

### 3.4 Research strategy

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

We opt for an approach combining ex vivo experiments using monocytes and tumor-associated macrophages with murine models for tumor growth and drug resistance, as well as human pancreatic cancer material. In detail:

**Ad 1: Determining whether macrophages are the [REDACTED] cells responsible for [REDACTED] (drug resistance in) pancreatic cancer** - Preliminary *in vitro* experiments suggest that macrophages could be the responsible cells for [REDACTED] drug resistance. [REDACTED], [REDACTED] drives macrophage migration both *in vivo* and *in vitro* and macrophages limit gemcitabine efficacy *in vitro* ([REDACTED]). The real importance of macrophages in [REDACTED] drug resistance needs to be proved or refuted *in vivo* however. Consequently, gemcitabine efficacy will be analyzed in [REDACTED] pancreatic tumors growing in macrophage depleted (wild type or [REDACTED] mice and in bone marrow transplanted (wild type bone marrow to [REDACTED] and vice versa) mice. If macrophages are indeed the cells responsible for [REDACTED] dependent drug resistance, we will next perform *ex vivo* experiments to elucidate the mechanism. In these latter experiments, tumor-associated macrophages isolated from wild type or [REDACTED] will be co-cultured with tumor cell lines (*in vitro*).

**Ad 2: Elucidation of the endogenous [REDACTED] [REDACTED] in the setting of pancreatic cancer** - Ten different [REDACTED] [REDACTED] have been described in different model systems but the [REDACTED] in the setting of pancreatic cancer remains elusive. Consequently, we aim to identify the [REDACTED] driving (drug resistance of) pancreatic cancer. To this end, a hypothesis driven approach in which the expression of all currently known [REDACTED] [REDACTED] is assessed in pancreatic cancer biopsies is combined with unbiased (i.e. without a priori hypotheses) approaches using [REDACTED]. The unbiased approach is included as novel [REDACTED] capable of activating [REDACTED] are still being identified, and it may well be that [REDACTED] in pancreatic cancer is activated by a [REDACTED] not yet known to activate [REDACTED]. The relevance of the identified [REDACTED] [REDACTED] is validated in the pancreatic cancer model(s) either using pharmacological inhibitors or using knock-out mice.

**Ad 3: Establishing whether [REDACTED] (drug resistance in) pancreatic cancer is a general mechanism** - The experiments leading up to this proposal have been performed using a single ([REDACTED] pancreatic cancer model in combination with a single chemotherapeutic drug. It is thus pivotal to validate our findings in alternative pancreatic cancer models using different chemotherapeutic agents to assess the general nature of our finding that [REDACTED] drives drug resistance in pancreatic cancer. In case [REDACTED] also drives drug resistance in alternative models, targeting [REDACTED] in the clinical setting may be pursued. In case [REDACTED] induces resistance in specific models, future experiments should identify the characteristic differences between the models responsible for the differential effects, and targeting [REDACTED] in the clinical setting should in that case not (yet) be pursued.

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

In all three different parts of the project, we will employ [REDACTED] pancreatic cancer models. In these models, murine pancreatic cancer cells are injected into the pancreas of wild type or genetically modified mice for [REDACTED] tumors to develop (for details, see appendix "animal procedures 3.4.4.1"). We opt for [REDACTED] models using murine pancreatic cancer cells, considering the importance of the immune system in pancreatic cancer development and drug resistance. In most experiments, we will inject [REDACTED] pancreatic cancer cells, as these cells are most frequently used in literature to induce [REDACTED] pancreatic tumors and as these cells were used in the preliminary experiments that form the basis of this application. In these experiments we observed that [REDACTED] tumors grew slower in gemcitabine-treated [REDACTED] deficient mice as compared to gemcitabine-treated wild type mice. To allow proper mechanistic studies, the experiments proposed in objectives 1 and 2 need to be performed using the same model. To address objective 3, we will compare the [REDACTED] model with an [REDACTED] model using an alternative murine pancreatic cancer cell line and with combination with a subcutaneous model. In detail:

**Ad 1: Macrophages in drug resistance** – To prove or refute the key role of macrophages in drug resistance of pancreatic cancer, we will [REDACTED] [REDACTED] and we will exchange macrophages between wild type and [REDACTED] [REDACTED] by [REDACTED]. Subsequently, [REDACTED] tumor growth is assessed as indicated in appendix "animal procedures 3.4.4.1".

Clodronate - The systemic injection of liposome-encapsulated clodronate in mice rapidly depletes peripheral monocytes (90% within 24 hours) as well as resident tissue macrophages, although with a lower efficacy. Moreover, clodronate treatment selectively induces apoptotic cell death in monocytes and macrophages without affecting lymphocytes and neutrophils and, unlike other methods of macrophage depletion, clodronate treatment does not result in secretion of pro-inflammatory cytokines. Macrophage depleted (or not, in the control situation) wild type and [REDACTED] will be subjected to the [REDACTED] [REDACTED] pancreatic cancer model. After tumor cell injections, mice are randomized and subjected to gemcitabine or solvent control treatment. In subsequent experiments, we may deplete monocytes/macrophages later after tumor cell injections to assess the time frame in which [REDACTED] exerts its effects.

Bone marrow transplantation - In these experiments, wild type bone marrow is transplanted into irradiated wild type and knock-out mice whereas knock-out bone marrow is transplanted into irradiated knock-out mice or wild type mice (the mice receiving bone marrow of their own genotype, like for instance wild type to wild type, serve as controls in subsequent experiments). One week after tumor cell injections into the pancreas, mice are randomized for gemcitabine or solvent control treatment.

If the in vivo experiments show that macrophages are indeed essential for [REDACTED] dependent drug resistance, subsequent mechanistic *ex vivo* experiments will be performed using tumor-associated macrophages isolated from wild type and/or [REDACTED] mice. To this end, excised tumors are minced, treated with collagenase, and macrophages are isolated by FACS sorting. The isolated macrophages are used in co-cultures with (different) pancreatic cancer cell lines to assess their effect on chemotherapy (gemcitabine, nab-paclitaxel and FOLFIRINOX)-induced cytotoxicity. To determine whether direct cell-contacts are essential in macrophage-induced drug resistance, similar experiments using growth medium obtained from the different macrophages instead of the macrophages themselves will be performed.

**ad 2: Endogenous [REDACTED] agonist** - We will determine which of the known [REDACTED] a [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] is present/expressed (on mRNA and protein level) in [REDACTED] grown [REDACTED] pancreatic tumors and healthy control pancreas. Expression levels will be determined at different time intervals after cancer cell injection to assess "the time of onset" of [REDACTED] [REDACTED] expression. All proteases that are present either in plasma or tumors are potential [REDACTED] and these [REDACTED] will be studied in vitro for their effect on tumor growth and drug resistance. Moreover, levels of these [REDACTED] [REDACTED] will be analysed in patient biopsies to correlate expression levels with disease progression and drug response.

In addition to the hypothesis driven approach, we will also perform an unbiased (hypothesis free) approach which would allow the identification of novel (not

yet described) ██████████ in the setting of pancreatic cancer. To this end, ██████████ grown pancreatic tumors (and control non tumor containing pancreas) are homogenised and subjected ██████████. As obviously not all p ██████████ present in pancreatic cancers are able to ██████████ we will next analyse the capacity of the identified ██████████ using an in vitro model system.

**ad 3: General nature of ██████████ drug resistance** – We will assess the effect of ██████████ on the efficacy of alternative chemotherapeutic agents using the ██████████ model. We will compare gemcitabine with nab-paclitaxel (drug used in some patients shown to target both tumor cells and the ██████████ compartment) and with FOLFIRINOX (drug combination shown to be effective in a small group of patients). We opt for these three different chemotherapeutic agents as these three drugs –with a different mode of action- are used in the clinics.

In addition, we will determine whether ██████████ also drives gemcitabine resistance of an ██████████ model using KP pancreatic cancer cells. These tumor cells (derived from pancreatic adenocarcinomas from p48-CRE/LSL-KRAS/P53flox/flox mice) harbour different mutations as the ██████████ cells and are thus perfectly suited to determine whether ██████████ drug resistance is dependent on the genetic status of the tumor cells. Depending on the results with the different chemotherapeutic agents in the ██████████ model, we may analyse the effect of either nab-paclitaxel or FOLFIRINOX in the “KP” ██████████ model. If ██████████ also modifies drug resistance in the KP model, and if macrophages play a key role in ██████████ resistance in the Panco2 model (objective 3.1), we may perform either clodronate depletion or bone marrow transplantation (the most effective strategy in objective 3.1) experiments in the KP model to assess whether macrophages also drive resistance in the KP model.

██████████ tumor models are generally preferred over subcutaneous models because ██████████ models are more similar to clinical tumors due to the establishment of a heterogeneous tumor microenvironment, the expression of biologically relevant growth factor receptors and proteins, and the metastatic potential of tumor cells to spread to distant sites, thereby reflecting the natural course of clinical cancers (Fung, BMC Cancer 15, 112, 2015). One could however argue that handling of the pancreas during tumor cell injection may lead to pancreatitis. To rule out that that the effects observed in the ██████████ model is due to ██████████ pancreatitis, we will analyse the effect of gemcitabine in a subcutaneous ██████████ model.

If the results of Objective 1 (see section 3.2) show that ██████████ expression on macrophages determines drug resistance, we will perform bone marrow transplantation experiments in which ██████████ (or wild type control) BM is transplanted into irradiated KPC mice (mice harbouring three mutations leading to spontaneous pancreatic cancer development). Mice between 6-8 weeks of age, when on average the first signs of pancreatic cancer arise, will be used in the BM experiments. After engraftment, mice are randomized for saline or chemotherapy treatment.

One of the most interesting results of our preliminary experiments is that in ██████████% of gemcitabine treated ██████████ ██████████ no tumor could be observed at sacrifice whereas in the other ██████████ mice only very small necrotic tumors were found. To assess whether indeed no residual tumor cells are present in gemcitabine treated ██████████ animals and thus whether tumors are completely regressed or only delayed, we will sacrifice mice at different time intervals after ending chemotherapy. In addition, we will initiate chemotherapy later after tumor cell injection to determine whether the treatment effect is also potentiated by ██████████ during later stages of pancreatic cancer growth.

---

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

All experiments should result in a better understanding of the role of ██████████ in pancreatic cancer in general and that of macrophage specific ██████████ in resistance to chemotherapy in particular. The three individual aims (i.e. objectives, see section 3.2) address independent research questions that are not directly dependent on each other for successful completion. Importantly however, results of the individual parts (objectives) will guide experiments in the other parts/objectives (for instance, the ██████████ identified for objective 2 will be targeted in the most relevant model identified in objective 3). All experiments together will ultimately lead to a comprehensive understanding of ██████████ in pancreatic cancer.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	██████ pancreatic cancer model
2	Subcutaneous pancreatic cancer model
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--------------------------|
| 1             | pancreatic cancer model  |

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

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Pancreatic cancer cells are injected into the pancreas for [redacted] tumors to develop/grow. At different time intervals after cancer cell injection, mice are killed to excise primary tumors after which both size and weight are determined. Lymph nodes and distant organs (spleen, liver, lung, intestine) are

harvested for both macroscopic and microscopic analysis of metastases. Both primary tumors and metastases will be (immuno)histologically analysed for tumor cell proliferation markers, fibroblast numbers/differentiation status, extracellular matrix production, (lymph)angiogenesis, monocyte/macrophage numbers and/or macrophage differentiation.

In certain experiments, mice will be killed at different time intervals after tumor cell inoculation in order to isolate tumor-associated macrophages and/or tumor-associated fibroblasts which will be used ex vivo. To this end, tumors are excised and subjected to specific purification protocols for either macrophages or fibroblasts.

---

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

After anaesthesia and pain killing, pancreatic cancer cells (either alone or mixed with fibroblasts) will be injected into the pancreas via a small incision on the abdominal region of the animal. Mice may be treated with either chemotherapy, potential ( ) inhibitors of tumor growth or clodronate liposomes. In certain experiments, blood may be collected at different time intervals before and after tumor cell inoculation (maximal 8 ml/kg/2 weeks or 7.5% of the blood volume/week; according to Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15-23, 2001). At the end of the experiment, mice will be sacrificed by cervical dislocation after anaesthesia. During the experiment, mice will be weighed once or twice a week.

In specific experiments aimed to study the importance of immune cell infiltrates into the tumor, bone marrow transplanted mice will be subjected to the pancreatic cancer model. To this end, donor mice (wild type and knock-out) are sacrificed under anaesthesia after which their tibias and femurs are collected to isolate bone marrow cells. Bone marrow collected from 1 donor mouse is used to transplant into 4 recipients.

Two weeks before transplantation, recipient mice are changed to drinking water with antibiotics. At the day of transplantation, recipient mice receive a total body irradiation after which donor-derived bone marrow cells are injected into the tail vein of the recipients. Several weeks after bone marrow transplantation, engraftment of donor cells is determined and mice with proper engraftment of donor bone marrow are used in pancreatic cancer models. At this time point, the drinking water will be changed back to normal water.

---

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

Most importantly, power calculations will be performed to determine the smallest group size necessary to obtain significant findings. We will continuously repeat the power calculations to adjust group sizes in subsequent experiments based on the most recent data. Furthermore, we will combine as much experiments as technically possible to reduce the number of control groups used. Finally, obtained results will guide subsequent experiments (like for instance, only drugs that efficiently limit tumor progression in the model will be used in the alternative KP model).

To determine the expected number of mice to be used in the current project, we envision standard experiments to consist of four to maximal six groups (six groups is the maximal number that can be included on a single day) of mice. 1. Wild type mice, untreated; 2. wild type mice, treatment 1; 3. wild type mice, treatment 2 (either different compound, or different concentration of the compound as treatment 1); 4. deficient mice (either or deficient), untreated; 5. deficient mice (either or treatment 1 and 6. wild type mice, treatment 2 (either different compound, or different concentration of the compound as treatment 1). Based on the most recent experiments employing the model, power calculations suggest we need 10 mice per group, and a standard experiment thus contains 40-60 mice. Moreover, we expect to perform the following experiments in the five year project:

Experiments for Purpose 1:

1.1. Gemcitabine effect after macrophage depletion in model using pancreatic cancer cells.

1.2. Gemcitabine effect after bone marrow transplantation in model using pancreatic cancer cells.

1.3 Gemcitabine effect after macrophage deletion of deficient mice transplanted with wild type bone marrow in model using

pancreatic cancer cells.

1.4. Gemcitabine effect after delayed macrophage depletion in [REDACTED] model using [REDACTED] pancreatic cancer cells (i.e. depletion starting after tumor cell inoculation).

1.5. Ex vivo experiments using using tumor-associated macrophages isolated from wild type and [REDACTED] mice.

Experiments 1.1 and 1.2 are key experiments (to prove or refute the importance of macrophages in [REDACTED] [REDACTED] resistance) that supplement each other and both these experiments will be performed independent of the results of the other experiment. If both the macrophage depletion (1.1) and bone marrow transplantation (1.2) experiments suggest macrophages indeed drive [REDACTED] [REDACTED] drug resistance, we may also deplete macrophages in [REDACTED] deficient mice transplanted with wild type bone marrow (1.3). Obviously, the delayed macrophage depletion experiment (1.4) will only be performed when experiment 1.1 shows a role of macrophages in [REDACTED] [REDACTED] resistance. The ex vivo experiments (1.5) will only be performed when experiments 1.1 and/or 1.2 shows a role of macrophages in [REDACTED] [REDACTED] drug resistance.

Experiments for Purpose 2:

2.1. [REDACTED], immunohistochemical and purification experiments using plasma, pancreas and/or pancreatic tumors from wild type and [REDACTED] deficient mice.

2.2. Validation potential [REDACTED] identified in 2.1 in the [REDACTED] model using [REDACTED] pancreatic cancer cells.

It is difficult to predict the number of [REDACTED] [REDACTED] that will be expressed/identified in pancreatic cancer in 2.1. We will however limit the validation experiments to a maximum of four different [REDACTED] which will be selected based on (differential) expression levels between tumor and healthy pancreas and on the availability of pharmacological inhibitors or deficient mice. In case pharmacological inhibitors have not been tested before in mice, we will either test 2 different concentrations or we will first perform dose-finding experiments.

Experiments for Purpose 3:

3.1. Different chemotherapeutic agents in the [REDACTED] model using [REDACTED] pancreatic cancer cells.

3.2. Most efficient chemotherapeutic agents (obtained in 3.1) in the [REDACTED] model using KP pancreatic cancer cells.

3.3. Most efficient macrophage depletion protocol (obtained in 1.2 and 1.3) in the [REDACTED] model using KP pancreatic cancer cells.

3.4. Most effective [REDACTED] [REDACTED] inhibitors (or knock out mouse, identified in 2.2) in in the [REDACTED] model using KP pancreatic cancer cells.

As indicated, the exact nature of experiments 3.2, 3.3 and 3.4 is based on the results of other parts of the project. Importantly however, we will only analyse cell types, drugs, or [REDACTED] in the KP model that have shown positive results in the [REDACTED] model.

Considering that a standard experiment consist of 60 mice, and the number of experiments indicated above, we will use a number of mice around 850-950 in the actual in vivo experiments. In addition, we need donor mice for the bone marrow experiments, and we need mice for the ex vivo experiments (around 100-150 mice in total). Moreover, we need to repeat key experiments to allow publication in high impact journals that require data of independent experiments (1 key experiment per Purpose; around 200-250 mice). Overall, we thus expect to use around 1200-1300 mice in total.

---

## **B. The animals**

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

- mus musculus (as genetically modified mice are available, and the availability of a good [REDACTED] model in mice).

- Wild type and genetically modified [REDACTED] knock outs for [REDACTED] mice.
- Mice between 7 and 12 weeks of age. In case of using bone marrow transplanted mice, the age may increase to 16 weeks).
- Knock out mice are bred in the Animal facility of the Academic Medical Center Amsterdam, whereas age and sex matched wild type mice will be purchased from licenced companies like Charles River or Harlan. The wild type mice are housed at least 1-2 weeks in the Animal facility of the Academic Medical Center Amsterdam before being used in the experiments.
- The maximal number of mice needed to perform all experiments within the 5 years of the project will be 1300.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement - Pancreatic cancer is a complex process involving multiple cell types (cancer cells, macrophages, fibroblasts, endothelial cells) that interact in a spatial and temporal dependent manner ultimately leading to tumor growth and metastasis. These complex interactions cannot be accurately mimicked *in vitro* and consequently we do need experimental animals. All animal experiments will however be based on *in vitro* / *ex vivo* findings, and we also aim to address follow up questions based on results of the animal experiments first *in vitro* / *ex vivo* (for instance, If the animal experiments show that macrophages are key cells in drug resistance, the underlying mechanism will first be elucidated *in vitro/ex vivo*).

Refinement - To minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia and pain killing (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the mice for signs of discomfort and apply humane endpoints (see for details section "Classification of discomfort/humane endpoints" below) . To further refine the experiments, mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water.

Reduction - To reduce the number of mice to be used as much as possible, we will use minimal group sizes to obtain significant differences, and we will continue to monitor variability in our experiments to adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments. Moreover, results obtained in experiments will guide future experiments as indicated above. For the bone marrow transplantation experiments, we will use 1 donor mouse to transplant into 4 recipients and the recipients are housed in filter tops and receive antibiotics in their drinking water to prevent infections (and thus discomfort or loss of animals). Moreover, we aim to reduce the number of control groups used in the experiments by combining different experiments (if possible), and we will

minimise the number of mice to be bred by using a homozygous breeding strategy and by using both male and female mice. Finally, we will perform *ex vivo* / *in vitro* experiments using tumor-derived cells instead of *in vivo* experiments whenever possible. Importantly, from a single tumor we may obtain sufficient cells to perform an *ex vivo* experiments in 8-plo.

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

As indicated above, we will use anaesthesia and pain killing. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I and DM-II guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry mouse barrier facility of the AMC). Adverse effect on the environment are further minimised by the fact that only organs/tissues taken from mice will be transported to the Laboratory in double sealed containers after which the organs/tissues are analysed in appropriate (ML-I/ML-II) laboratories.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

At least once a week, we perform extensive literature analyses (using PubMed with search terms "pancreatic cancer", "████████████████████" and "macrophages" and we regularly visit scientific meetings to avoid performing experiments already performed before. The fact that the current project has recently been funded after international peer review suggests that the experiments are indeed novel (and scientifically important).

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

### G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The discomfort of mice subjected to the ██████████ pancreatic cancer models consists of:

- Laparotomy under anaesthesia → pain killing used → moderate discomfort
- Tumor cell injections → under anaesthesia using pain killing → mild discomfort
- Recovery from surgery/anaesthesia → pain killing used → mild discomfort
- Injections (chemotherapeutics/drugs/inhibitors/liposomes/etc) → mild discomfort
- Side effects chemotherapeutics → moderate discomfort
- Blood sampling (only in some mice) → mild discomfort
- Tumor growth → mild discomfort for small tumors (i.e. early after tumor cell injection and/or after chemotherapeutic drugs) and moderate discomfort for larger tumors
- Irradiation of recipient mice in the bone marrow experiments → moderate discomfort

Discomfort of the donors for the bone marrow transplantation experiments:

- isolation bone marrow cells → after cervical dislocation after anaesthesia → mild discomfort

Occasionally (< 5%), mice subjected to the ██████████ model may die due to abdominal bleeding.

Overall, we expect the discomfort to be moderate

Explain why these effects may emerge.

We do not fully understand the rare occurrence of bleeding in the mice. The fact that we never observe abdominal bleedings in control (non tumor bearing) mice suggest the bleedings are related to tumor development. It may be that tumors (which are well-known to be thrombogenic in patients) induce a DIC (disseminated intravascular coagulation) phenotype due to consumption of blood coagulation factors and subsequent bleeding complications.

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

We monitor the mice for humane end points and as soon as the humane endpoints (see below) are reached, mice will be sacrificed.

### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

(1) bad overall behaviour (rough fur, hunched bag, walking on his toes , diarrhea), (2) weight loss of >15% compared to highest body weight measured.

Indicate the likely incidence.

Rarely (<5% of the mice).

### **K. Classification of severity of procedures**

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

Moderate

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Organs and tumors have to be collected for analysis.

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

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

Yes



## Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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'.	11800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Academic Medical Center Amsterdam	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Subcutaneous pancreatic cancer model

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

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Pancreatic tumors will be grown for a maximum of 8 weeks. At sacrifice, primary tumors are excised after which the size and weight are determined as primary end-point for effect of treatment (or genetic ablation in case of knock out mice). Distant organs (spleen, liver, lung, intestine) are harvested for both



macroscopic and microscopic analysis of metastasis which serves as secondary outcome parameter. Both primary tumors and metastasis may be (immuno)histologically analysed for tumor cell proliferation markers, fibroblast numbers/differentiation status, extracellular matrix production, (lymph)angiogenesis, monocyte/macrophage numbers and/or macrophage differentiation for mechanistic explanations of observed differences in the primary or secondary outcome parameters.

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

After anaesthesia, pancreatic cancer cells will be injected into the flanks of the animals. Mice may be treated with either chemotherapy, potential (██████ dependent) inhibitors of tumor growth or clodronate liposomes. In certain experiments, blood may be collected at different time intervals before and after tumor cell inoculation (maximal 8 ml/kg/2 weeks or 7.5% of the blood volume/week; according to Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15-23, 2001). Mice will be sacrificed by cervical dislocation after anaesthesia. During the experiment, mice will be weighed once a week, whereas tumor size is determined at least once every two weeks.

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

Power calculations will be performed to determine the smallest group size necessary to obtain significant findings. As for the ████████ model, we will continuously repeat the power calculations to adjust group sizes based on the most recent data. Furthermore, we will combine as much experiments as technically possible to reduce the number of control groups used. Finally, we will only analyse treatment combinations that show promising effects in the ████████ models, and treatments without effect in the ████████ model will thus not be tested in the subcutaneous model.

To determine the expected number of mice to be used in the current project, we envision standard experiments to consist of four to maximal six groups of mice. 1. Wild type mice, untreated; 2. wild type mice, treatment 1; 3. wild type mice, treatment 2 (either different compound, or different concentration of the compound as treatment 1); 5. deficient mice (either ████████ or ████████ ████████ untreated; 5. deficient mice (██████████ or ██████████████ deficient), treatment 1 and 6. wild type mice, treatment 2 (either different compound, or different concentration of the compound as treatment 1). Based on literature, we expect to need 8-10 mice per group, and a standard experiment thus contains 32-60 mice. Moreover, we expect to perform maximal 3 treatment protocols in the five year project leading to a total of 100-180 mice.

## **B. The animals**

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

- mus musculus (as genetically modified mice are available, and the availability of a good ████████ model in mice).
- Wild type and genetically modified (██) mice.
- Mice between 7 and 12 weeks of age (We aim to use young adults mice of 8-10 weeks but to obtain sufficient group sizes in experiments we may use slightly younger or older mice).
- Knock out mice our bred in the Animal facility of the Academic Medical Center Amsterdam, whereas wild type mice will be purchased from licenced companies like Charles River or Harlan.
- We expect the number of mice needed to perform all experiments within the 5 years of the project to be max 180.

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

The aim of the current project is to study the relationship/importance of multiple cell types in pancreatic cancer. To mimic the complex interplay between cell types (both tumor cells but also immune cells recruited from the bloodstream), the subcutaneous model we propose to perform is an important model next to the [REDACTED] model. The [REDACTED] model obviously mimics the human setting into more detail, but the subcutaneous model is important to rule out that any effect observed in the [REDACTED] model is due to [REDACTED] pancreatitis which may occur due to handling of the pancreas during tumor cell injections. To minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the mice for any sign of discomfort and mice with too much discomfort (thus reaching the humane endpoint; see at point J below) will be sacrificed. To further refine the experiments, mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water.

To reduce the number of mice to be used as much as possible, we will use minimal group sizes to obtain significant differences, and we will continue to monitor variability in our experiments to adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments. Moreover, we will only use the model to confirm key findings of the [REDACTED] model.

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

As indicated above, we will use anaesthesia and pain killing. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I and DM-II guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry mouse barrier facility of the AMC). Adverse effects on the environment are further minimised by the fact that only organs/tissues taken from mice will be transported to the Laboratory in double sealed containers after which the organs/tissues are analysed in appropriate (ML-I/ML-II) laboratories.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

At least once a week, we perform extensive literature analyses (using PubMed with search terms "pancreatic cancer", "████████████████████" and "macrophages" and we regularly visit scientific meetings to avoid performing experiments already performed before. The fact that the current project has recently been funded after international peer review suggests that the experiments are indeed novel (and scientifically important).

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

### G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Tumor cell injections → under anaesthesia → mild discomfort
- Recovery from anaesthesia → mild discomfort
- Injections ( [REDACTED] ( [REDACTED] inhibitors) → mild discomfort
- Tumor growth → mild discomfort for small tumors (i.e. early after tumor cell injection and/or after chemotherapeutic drugs) and moderate discomfort for larger tumors

Overall, we expect the discomfort to be moderate.

Explain why these effects may emerge.

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

We monitor the mice and will sacrifice mice as soon as humane endpoint are reached.

#### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

(1) bad overall behaviour (rough fur, hunched bag, walking on his toes, reduced mobility , diarrhea), (2) weight loss of >15% compared to highest body weight measured, (3) tumor size > 2 cm<sup>3</sup>.

Indicate the likely incidence.

Very unlikely in a subcutaneous model.

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

Moderate

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Organs and tumors need to be obtained for analysis.

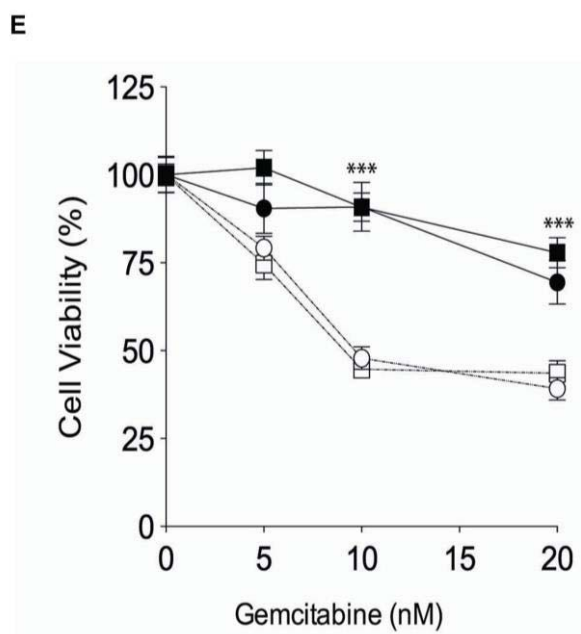
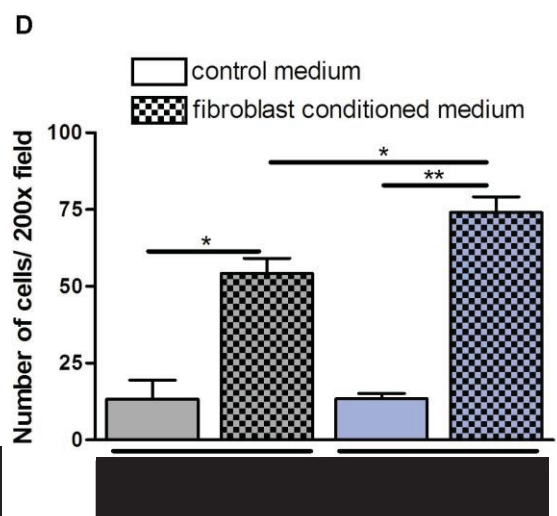
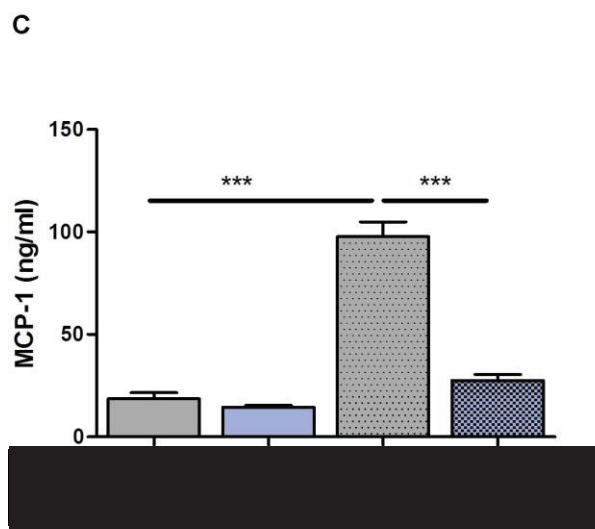
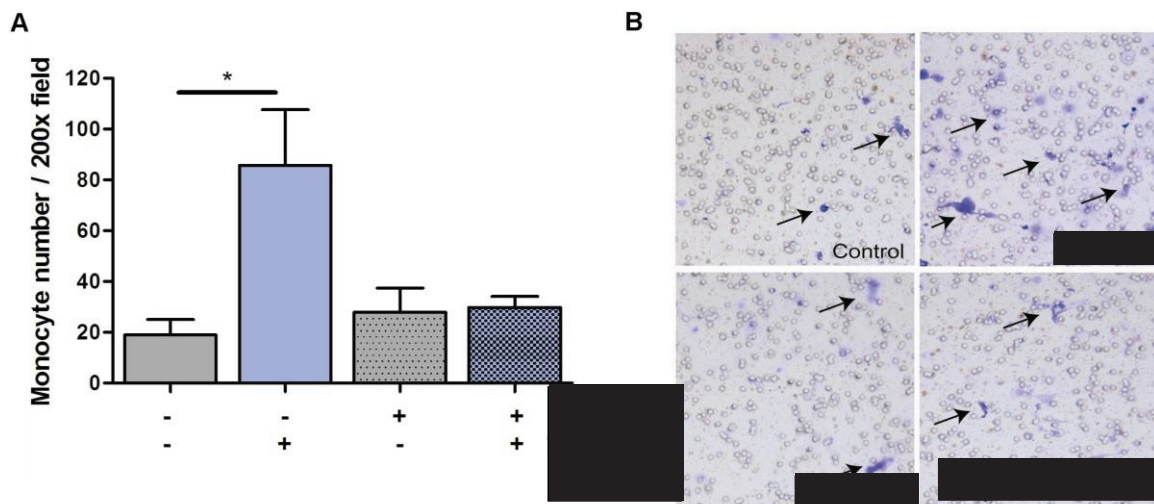
Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

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

Yes



**Appendix 1 of project entitled “ [REDACTED] in pancreatic cancer”.**



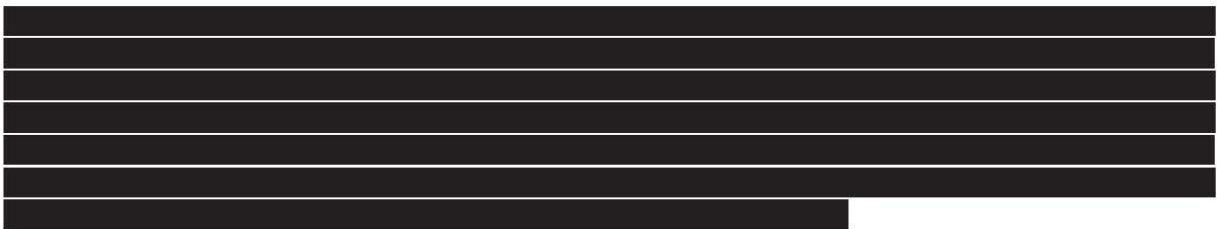
RAW264.7 cells (mean±SEM of an experiment performed three times). (B) Representative pictures of cells migrated through the transwell. (C) MCP-1 levels in medium of C3H10T1/2 cells without or with [redacted] stimulation by [redacted] in the presence or absence of [redacted]. Shown is the mean±SEM of an experiment performed three times. (D) Migration of RAW264.7 cells towards fibroblast conditioned medium prepared in the absence or presence of [redacted]. RAW264.7 cell migration towards plain medium with or without [redacted] was used as experimental control. Shown is the mean±SEM of an experiment performed three

times. (E) RAW264.7 conditioned medium induces gemcitabine resistance of [redacted] cells. Compare black squares/circles (RAW264.7 conditioned medium) with open white squares/circles (control medium). Shown are the mean±SEM of two independent experiments performed in octoplo.

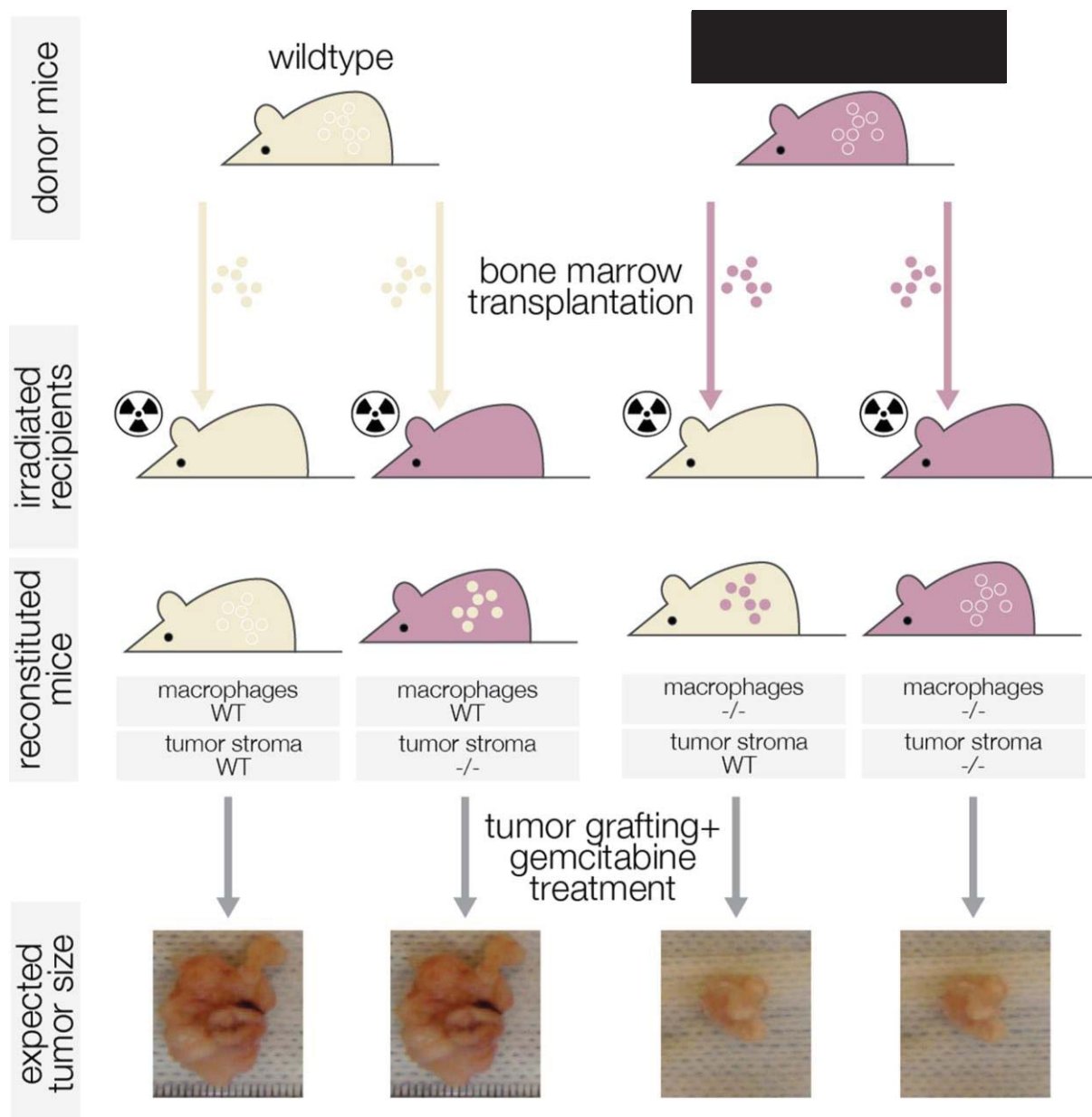
A



B







**Figure 3: Bone marrow transplantation experiments to identify the cell types involved in [redacted] driven pancreatic cancer growth and drug resistance.** Bone marrow obtained from wild type mice will be transplanted into irradiated wild type (control) and [redacted] recipient mice, whereas bone marrow obtained from [redacted] mice will be transplanted to irradiated [redacted] (control) and wild type recipient mice. Six weeks later, mice are subjected to the [redacted] pancreatic cancer model in the absence or presence of gemcitabine. If (for instance) macrophage [redacted] determines gemcitabine resistance, we expect large tumors in mice containing wild type bone marrow and small tumors in mice containing [redacted] [redacted] bone marrow.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medical Centre Amsterdam

Meibergdreef 31  
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD118002015222

**Bijlagen**

2

Datum 20-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002015222. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Gegevens aanvrager**

## Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800

Naam instelling of organisatie: Academisch Medical Centre Amsterdam

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 343362777

Straat en huisnummer: Meibergdreef 31

Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM

IBAN: NL68TABO0136166741

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: AMC Crediteurenadministratie

## Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 september 2015  
Geplande einddatum: 30 augustus 2020  
Titel project: [REDACTED] in pancreatic cancer  
Titel niet-technische samenvatting: Betera chemotherapie bij alvleesklierkanker  
Naam DEC: DEC AMC  
Postadres DEC: Meibergdreef 31  
E-mailadres DEC: dec@amc.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting ■

Overige bijlagen:  DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Amsterdam  
Datum: 18 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medical Centre Amsterdam

Meibergdreef 31  
1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD118002015222

**Bijlagen**

2

Datum 20-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 20 augustus 2015

Vervaldatum: 19 september 2015

Factuurnummer: 201570222

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002015222	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.