

Inventaris Wob-verzoek W16-19S									
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016499								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Advies CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x	x	

01 APR. 2016



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10300
		<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	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9
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	Geert Grootplein 10
		Postbus	9101 [Redacted]
		Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
		IBAN	NL90ABNA0231209983
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
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	[Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Post-Doctoraal onderzoeker
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 . 0 5 . 2 0 1 6
- Einddatum 0 1 . 0 5 . 2 0 2 1
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische ind
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van reactieve nanomedicijnen voor effectieve kankertherapie met minder
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

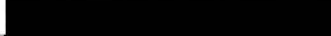
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

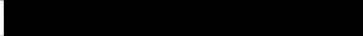
5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- DEC advies en factuurinformatie

6 Ondertekening

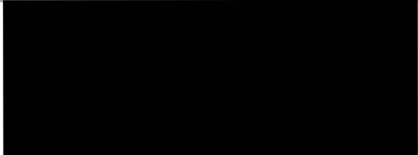
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende 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 Nijmegen

Datum 3 1 - 0 3 - 2 0 1 6

Handtekening 

Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische index van chemotherapie |

2 Categories

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

Een vaak toegepaste behandeling voor kanker is chemotherapie. Hierbij worden medicijnen toegediend die tumorcellen doden of deze remmen in hun groei. Een probleem van chemotherapie is echter dat de medicijnen vaak kleine moleculen zijn, die naast op de plek van de tumor ook in andere delen van het lichaam uit de bloedvaten kunnen treden. Hierdoor worden ook gezonde cellen aangetast en kunnen er ernstige bijwerkingen optreden.

Een mogelijke oplossing voor dit probleem is het verpakken van de chemotherapeutische middelen in nanodragers. De combinatie van de nanodrager en het chemotherapeutisch middel wordt een nanomedicijn genoemd, wat gezien kan worden als medicijnafgiftesysteem. Nanomedicijnen zullen door hun grootte voornamelijk uit de relatief lekke tumorbloedvaten treden en daar hun inhoud vrijgeven. Op deze manier worden bijwerkingen door ongewenste afgifte van de cytotoxische medicijnen elders in het lichaam beperkt.

Een bekend en veel gebruikt voorbeeld van een dergelijk nanomedicijn is Doxil/Caelyx. Bij dit nanomedicijn is het medicijn doxorubicine verpakt in een liposoom, een type nanodrager (zie Abraham 2005, *Methods Enzymol.* 2005;391:71-97). Aan dit nanomedicijn zijn polyethyleen glycol (PEG) ketens bevestigd, welke de circulatietijd en op die manier de ophoping van de nanomedicijnen in de tumor verhogen.

Een nadeel van deze nanomedicijnen is echter dat ze lange tijd in de bloedbaan aanwezig zijn en zich daardoor ook geleidelijk op andere plekken in het lichaam op kunnen hopen. Dit kan toxische bijeffecten met zich meebrengen, zoals ontstekingen aan handen en voeten (hand-voet syndroom) en in de mond (stomatitis). Deze toxische bijeffecten zijn een belangrijke beperkende factor bij hoe vaak, met welke tijdsintervallen en met welke dosis de chemotherapie gegeven kan worden. Daarnaast zijn ze zelfs een belangrijke oorzaak voor het stoppen van de behandeling (zie Charrois et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep;306(3):1058-67.4, Charrois et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609 (2003) 102– 108, Charrois et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1663 (2004) 167– 177). Charrois et al. hebben in een tumormodel in muizen onderzocht wat geschikte doseringsschema's zouden kunnen zijn voor liposomaal doxorubicine, waarbij voldoende therapeutische effectiviteit bereikt wordt met beperkte bijwerkingen. Ze kwamen tot de conclusie dat er een optimum bestaat in hoe vaak en met welke dosis liposomaal doxorubicine toegediend kan worden, om voldoende therapeutische effectiviteit te hebben zonder te sterke bijwerkingen. De bijwerkingen beperken dus nog altijd de toelaatbare dosis en frequentie van de chemotherapie en daarmee het klinisch resultaat van de behandeling. Daarom is het erg belangrijk om toxiciteitsproblemen als hand-voet syndroom en stomatitis te verminderen. De behandelingsmethode voor deze bijwerkingen is vaak primair het onderbreken of stoppen van de behandeling of enkel gericht op symptoombestrijding. Het onderbreken van de behandeling heeft echter negatieve gevolgen voor het klinisch resultaat. Daarom is er een

sterke behoefte aan een methode om de toxiciteitsproblemen te verminderen en de therapeutische index te verhogen. Relevante artikelen van Charrois et al zijn: Charrois et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep;306(3):1058-67.4), Charrois et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609 (2003) 102– 108, Charrois et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1663 (2004) 167– 177.

Dit project is erop gericht om de gerapporteerde toxiciteitsproblemen met deze lang circulerende nanomedicijnen te verminderen. Als oplossing voor dit probleem ontwikkelen we in dit project nanomedicijnen, die nadat ze zich opgehoopt hebben in de tumor (tijdstip wordt bepaald door biodistributie met radiogelabeld nanomedicijn), uit de bloedbaan geklaard kunnen worden met behulp van een klaringsmiddel. Dit klaringsmiddel, op basis van biocompatibele en bioafbreekbare particles van ca 500 nm, kan een verbinding aangaan met het nanomedicijn en dit afvoeren naar de lever, middels filtering door de lever (door de grootte van deze agents). Het is bekend dat dit soort particles ophopen in de lever en de milt en daar dan in enkele dagen worden afgebroken en afgevoerd. Aangezien het klaringsmiddel een diameter heeft van ca 500 nm, en de liposomen van ca 100 nm zullen ze tezamen dus niet zo groot worden dat ze vastlopen in de haarvaten. De hypothese van dit onderzoek is dat het nanomedicijn na maximale ophoping in de tumor efficiënt uit de bloedbaan geklaard kan worden door middel van een klaringsmiddel. Op deze wijze kan ongewenste afgifte van chemotherapie in overige delen van het lichaam beperkt worden, terwijl de concentratie van chemotherapie in de tumor minimaal beïnvloed wordt.

Voor klaring van de nanomedicijnen maken we gebruik van een modificatie van een bepaalde organische reactie, de inverse-electron demand Diels-Alder (invDA) ligatie. Deze reactie is in eerder onderzoek al met succes gebruikt voor het binden van een radioactieve probe aan een tumor-gebonden antilichaam in een "pre-targeting radioimmunoimaging en -therapy" opzet (zie R. Rossin, P. Renart Verkerk, S. M. van den Bosch, R.C.M. Vulders, I.Verel, J. Lub, and M.S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 3375-3378). Daarnaast wordt deze reactie ook gebruikt in onderzoek naar chemisch activeerbare antilichaam-drug conjugaten, waarin ook het verhogen van de therapeutische effectiviteit en verminderen van bijwerkingen centraal staat.

In het huidige onderzoek willen deze chemische reactie gebruiken om in vivo een chemische verbinding tussen het klaringsmiddel en de nanomedicijnen te bewerkstelligen. Hiertoe modificeren we de liposomen met trans-cycloocteen (TCO). Het klaringsmiddel wordt gemodificeerd met een tetrazine derivaat. De chemische verbinding wordt bewerkstelligd door een covalente reactie tussen het liposoom-gebonden TCO en het klaringsmiddel-gebonden tetrazine derivaat. Hierdoor kan het nanomedicijn uit de bloedbaan verwijderd worden, en de ophoping in bijvoorbeeld handen en voeten beperkt worden.

Initiële ontwikkeling van klaringsmiddelen is al uitgevoerd in voorgaande onderzoeken. Het is al aangetoond dat het gebruik van klaringsmiddelen kan leiden tot een >100-voud afname in TCO-antilichamen in het bloed (zie Rossin et al. *J Nucl Med* 2013; 54:1989–1995). Een vergelijkbaar effect met betrekking tot de klaring van liposomen zou erg voordelig zijn om de neventoxiciteit te beperken.

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?

Het doel van dit project is om te bepalen of nanomedicijntherapie gecombineerd met toediening van een klaringsmiddel gebruikt kan worden om bijwerkingen van chemotherapie te verminderen, terwijl de therapeutische effectiviteit minimaal beïnvloed wordt. De hoofdvraagstelling is of de concentratie nanomedicijn/chemotherapie in de overige delen van het lichaam verminderd kan worden, terwijl de concentratie in de tumor niet of minimaal beïnvloed wordt. Hiertoe worden nieuwe nanomedicijn-constructen ontwikkeld en in vivo getest en wordt de effectiviteit ervan gevalideerd.

Het project wordt haalbaar geacht binnen de looptijd van het project, omdat alle benodigde expertise en faciliteiten aanwezig zijn: Dit project is een samenwerking tussen onder andere [REDACTED]. Binnen de [REDACTED] is er veel ervaring met het maken van vergelijkbare nanomedicijnen en bloedkinetiek/biodistributie/kankertherapie studies zoals beschreven in dit projectvoorstel. [REDACTED] Ontwikkeling van de bouwstenen voor de TCO-nanomedicijnen en klaringsmiddelen wordt uitgevoerd door [REDACTED], [REDACTED], welke geruime specialistische ervaring hierin hebben. Alle faciliteiten voor het uitvoeren van het onderzoek zijn aanwezig, alsmede biotechnische ondersteuning.

3.3 Relevance

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

De lange circulatietijd van nanomedicijnen kan leiden tot ophoping van chemotherapeutische middelen in gezonde delen van het lichaam. Dit kan toxische bijeffecten met zich meebrengen, zoals ontstekingen aan handen en voeten (hand-voet syndroom) en in de mond (mucositis). Het is beschreven dat het hand-voet syndroom en mucositis de meest voorkomende dosis-limiterende toxiciteitsproblemen zijn, welke optreden in tot 50% van de patiënten. Alhoewel deze symptomen niet direct levensbedreigend zijn, kunnen ze wel de kwaliteit van leven verslechteren. Daarnaast zijn deze symptomen de belangrijkste oorzaak voor het verminderen van de behandelingsdosis en voor het afbreken van de behandeling. Wanneer nog in bloedbaan aanwezige chemotherapeutische nanomedicijnen dus weggevangen kunnen worden nadat een maximale concentratie in de tumor is bereikt, kunnen de bijwerkingen verminderd worden, terwijl de effectiviteit van de therapie onveranderd blijft of mogelijk zelfs verhoogd kan worden.

De uitkomsten van dit project zullen aangeven hoe de nanomedicijntherapie in combinatie met het klaringsmiddel op een optimale manier gegeven kan worden, of dit op een veilige manier gedaan kan worden, en of inderdaad effectiviteit van de therapie onveranderd blijft of zelfs verhoogd kan worden. Het op deze manier verhogen van de therapeutische index van chemotherapeutische nanomedicijnen zal resulteren in een beter klinisch resultaat van dergelijke behandelingen. Er wordt verwacht dat de uitkomsten van dit project niet alleen bruikbaar zijn voor verbetering van Doxil/Caelyx therapie, maar ook vertaalbaar zijn naar andere typen chemotherapie met vergelijkbare bijwerkingen.

Naast dit maatschappelijk belang heeft het behalen van de doelstelling ook een wetenschappelijk belang; het onderzoek zal inzicht geven in de ontwikkeling en in vivo toepassing van reactieve nanomedicijnen en klaringsmiddelen en de potentie van deze middelen voor het verminderen van bijwerkingen van chemotherapeutische nanomedicijnen demonstreren.

3.4 Research Strategy

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

Om het hoofddoel te bewerkstelligen wordt de volgende strategie gevolgd:

De chemisch reactieve (actief te klaren) nanomedicijnen en klaringsmiddelen worden gesynthetiseerd, gekarakteriseerd en verder ontwikkeld. Ze worden uitgebreid in vitro gekarakteriseerd en getest, om zo de reactiviteit en stabiliteit vast te stellen. Voor deze experimenten zijn geen proefdieren benodigd. Op basis van deze experimenten worden alleen de geschikte constructen geselecteerd voor vervolgentoetsen. Na deze in vitro tests worden de bloedkinetiek (en biodistributie aan het eind) van de geselecteerde nanomedicijnen en klaringsmiddelen bepaald in

niet-tumordragende muizen. Daarnaast zal de in vivo stabiliteit van de nanomedicijn-constructen worden bepaald, waarbij het van belang is dat de TCO voldoende stabiel is om in vivo te kunnen reageren met het klaringsmiddel.

In een volgende stap zal de tumor targeting en bloedklaring van de meest veelbelovende constructen uit het vorige experiment onderzocht worden. Daarnaast onderzoeken we in deze stap de ophoping van de nanomedicijnen en doxorubicine in overige weefsels en organen. Op basis van de resultaten van deze proef worden geschikte nanomedicijnconstructen geselecteerd voor een studie waarin gekeken wordt naar therapeutische effectiviteit.

In deze stap wordt de therapeutische activiteit van de nanomedicijnconstructen onderzocht. We onderzoeken dit door voor de beste nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie (en de nodige controlegroepen) de remming van de tumorgroei te volgen.

Tot slot onderzoeken we met behulp van histologie of er een mogelijk effect is van klaring van de nanomedicijnen naar de lever en eventuele ophoping in andere organen op de status van het weefsel.

Op basis van deze set experimenten kan vastgesteld worden op welke wijze en met welke constructen efficiënte en optimale klaring van het nanomedicijn geïnduceerd kan worden, waardoor bijwerkingen beperkt worden met minimale invloed op de therapeutische effectiviteit.

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.

De hoofdlijnen van het onderzoek kunnen opgedeeld worden in de volgende experimenten:

Experiment 1:

Het bepalen van de bloedklaring en stabiliteit van de nanomedicijnconstructen, de tetrazine-klaringsmiddelen, en de combinatie van deze twee componenten. Omdat de nadruk hierbij ligt op bloedkinetiek zal dit experiment gedaan worden in niet-tumordragende muizen. Nieuw ontwikkelde nanomedicijnen en klaringsmiddelen worden onderzocht, waarvan nog onbekend is welk farmacokinetisch gedrag ze zullen vertonen, en hoe effectief de klaring van het nanomedicijn in vivo zal plaatsvinden. Dit kan alleen met een bloedkinetiek/biodistributie experiment getoetst worden.

Voor dit experiment wordt het type dierproef 1, 'Testen van nanomedicijnen in muizen', ingezet.

Experiment 2:

Het bepalen van de bloedklaring en ophoping van de nanomedicijnconstructen in tumor en organen, en vergelijking met combinatie met klaring door middel van het tetrazine-klaringsmiddel construct. Hier proberen we de ophoping van de nanomedicijnen in de tumor ten opzichte van de ongewenste accumulatie in andere weefsels te optimaliseren. Bij experiment 2 zal de nadruk meer liggen op de vergelijking tussen tumor- en achtergrondaccumulatie van de nanomedicijnen, terwijl bij experiment 1 de nadruk meer lag op het bepalen van hoe de meest efficiënte klaring van de nanomedicijnen uit het bloed geïnduceerd kan worden. In experiment 2 zal dus gebruik gemaakt worden van tumordragende muizen.

Voor dit experiment wordt het type dierproef 1, 'Testen van nanomedicijnen in muizen', ingezet.

Experiment 3:

Het onderzoeken van het therapeutisch effect van de nanomedicijnen, en vergelijking met combinatie met klaring door middel van het tetrazine-klaringsmiddel. Van de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie zal in dit experiment primair de therapeutische effectiviteit worden getest door de remming van de tumorgroei te volgen. Er worden verschillende doseringen getest en daarnaast wordt deze therapie vergeleken met therapie zonder toevoeging van het klaringsmiddel, alsmede met de nodige controles (zoals placebobehandeling).

Voor dit experiment wordt het type dierproef 1, 'Testen van nanomedicijnen in muizen', ingezet.

Experiment 4:

Het histologisch onderzoeken van de mogelijke effecten van de nanomedicijntherapie (in combinatie met het klaringsmiddel) op de status van het weefsel, bijvoorbeeld de organen waar het middel naar wordt geklaard (lever en milt). Voor dezelfde groepen als beschreven voor experiment 3 wordt onderzocht of de klaring naar de lever en milt veilig kan worden geïnduceerd, zonder daarbij te sterke nadelige effecten op de status van deze weefsels te induceren.

Voor dit experiment wordt het type dierproef 1, 'Testen van nanomedicijnen in muizen', ingezet.

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

In de eerste fase van het onderzoek worden de chemisch reactieve (actief te klaren) nanomedicijnen en klaringsmiddelen gesynthetiseerd, gekarakteriseerd en verder ontwikkeld. Ze worden uitgebreid in vitro gekarakteriseerd en getest, om zo de reactiviteit en stabiliteit in buffer en serum vast te stellen. Na deze in vitro tests, waarvoor geen proefdieren benodigd zijn, selecteren we alleen de geschikte nanomedicijnen en klaringsmiddelen voor de dierexperimenten. Als de nanomedicijnen niet stabiel genoeg zijn of als de TCO onvoldoende reactief is met het tetrazine derivaat worden de nanomedicijnen niet geselecteerd voor vervolggexperimenten. Alleen de meest veelbelovende constructen zullen dus in een dierexperiment getest worden. Mbt het nanomedicijn zullen we doxorubicine gevulde liposomen bestuderen. We zullen starten met een formulatie die erg lijkt op Doxil en de TCO belading variëren. Afhankelijk van de resultaten is het mogelijk dat we de lipide formulatie nog iets aanpassen. Mbt het klaringsmiddel, zullen we werken met biocompatibele en bioafbreekbare particles beladen met tetrazine groepen. We zullen starten met polymelkzuur-gebaseerde particles van 500 nm. De grootte van deze particles en de tetrazine modificatiegraad wordt mogelijk gevarieerd.

Na deze in vitro tests zullen de volgende dierexperimenten gedaan worden:

Experiment 1: bloedkinetiek en biodistributie in muizen

In dit experiment wordt van de geschikt gebleken nanomedicijnen en klaringsmiddelen de bloedkinetiek (en biodistributie aan het eind) bepaald in niet-tumordragende muizen. Daarnaast zal de in vivo stabiliteit van de nanomedicijn-constructen worden bepaald door bloedmonsters ex vivo te laten reageren met tetrazine. De nanomedicijnen verschillen in samenstelling en TCO-modificatiegraad. De TCO-modificatiegraad heeft mogelijk invloed op hoe efficiënt de nanomedicijnen geklaard kunnen worden door middel van een klaringsmiddel. De samenstelling kan daarnaast invloed hebben op de bloedkinetiek. Er wordt begonnen met een samenstelling die vergelijkbaar is met die van Doxil/Caelyx (maar dan met eventuele TCO-modificatie) en indien nodig wordt deze aangepast.

Op basis van deze experimenten zullen alleen de veelbelovende constructen geselecteerd worden voor vervolggexperimenten, wat waarschijnlijk een sub-selectie zal zijn van de geteste nanomedicijn-constructen. Belangrijke criteria hierbij zijn dat de nanomedicijnen zonder toediening van het klaringsmiddel voldoende lang in de circulatie moeten blijven, dat de nanomedicijnen die TCO bevatten na toediening van het klaringsmiddel voldoende snel uit de bloedbaan geklaard moeten worden en dat de TCO van deze nanomedicijnen voldoende stabiel moet zijn in vivo. Omdat in dit experiment de nadruk ligt op de bloedkinetiek en klaring van de nanomedicijnen zijn er voor dit experiment geen tumor-dragende muizen nodig. Mogelijke toxiciteit van de nanomedicijnen kan in dit experiment nog niet onderzocht worden, omdat de muizen relatief kort na toediening van de nanomedicijnen (en eventueel het klaringsmiddel) worden opgeofferd, waarna de organen uitgenomen worden om de concentratie van de chemotherapeutische nanomedicijnen in verschillende organen en weefsels te bepalen. De organen zijn dus niet beschikbaar voor de histologische analyses om mogelijke toxiciteit te onderzoeken. Om mogelijke toxiciteitseffecten te onderzoeken zou het nodig zijn om de dieren tot langere tijd na toediening van de nanomedicijnen (en eventueel het klaringsmiddel) te laten leven. Op die manier kan namelijk het effect van opbouw van een therapeutische dosis nanomedicijn in de verschillende organen gevolgd worden, waardoor er mogelijk op een later moment toxiciteitsproblemen op zouden kunnen treden. Ook kan op die manier bekeken worden of bijvoorbeeld de organen waar het nanomedicijn naar geklaard wordt zich kunnen

herstellen na afvoer van de nanomedicijnen naar deze organen (indien daardoor schade aan deze weefsels zou ontstaan). Daarnaast kunnen eventuele toxiciteitseffecten dosisafhankelijk zijn en is de optimale therapeutische dosis mogelijk anders dan de dosis die gebruikt wordt in experiment 1, waarin een therapeutisch effect nog niet van belang is.

In experiment 2 en 3 wordt vervolgens gebruik gemaakt van tumordragende muizen, waarbij er is gekozen voor het 4T1 tumormodel. Dit tumormodel wordt gegroeid in de borstklier van vrouwelijke muizen. Charrois et al. hebben dit tumormodel ook gebruikt in hun onderzoek naar liposomaal doxorubicine. Hierbij stond het bepalen van de biodistributie en bloedkinetiek van doxorubicine dat verpakt was in verschillende liposomale formulaties centraal. Het doel van dat onderzoek was het bepalen van optimale doseringsschema's en het effect van de grootte en medicijnafgiftesnelheid van de liposomen op de therapeutische effectiviteit en toxische bijeffecten. Ze hebben in dit onderzoek waargenomen dat op ongeveer 24 uur na injectie van de nanomedicijnen de doxorubicineconcentratie in de tumor maximaal was, terwijl pas op een later moment een maximale doxorubicineconcentratie in de poten en huid van de muizen werd waargenomen. Het moment waarop de concentratie van doxorubicine/nanomedicijn in de tumor maximaal is, maar in de poten en huid nog niet, is ideaal voor toediening van het klaringsmiddel. Daarom lijkt dit tumormodel ook zeer geschikt voor dit project. Daarnaast is dit tumormodel een relevant model voor borstkanker, wat een van de kankertypes is waarbij de therapie met bijvoorbeeld Doxil/Caelyx liposomen klinisch toegepast wordt.

Van andere tumortypes is grotendeels onbekend wat de farmacokinetiek van de nanomedicijnen en verdeling over tumor en andere organen/weefsels zouden zijn, omdat dit in minder detail is uitgezocht. Het is dus ook onbekend of deze tumormodellen geschikt zouden zijn om de nanomedicijn+klaringsmiddel therapie mee te testen. Dit zou eerst uitgezocht moeten worden in aparte dierexperimenten, wat niet gewenst is.

Experiment 2: tumortargeting en biodistributie in tumordragende muizen

In een volgende stap zullen de ophoping van de chemotherapeutische nanomedicijnen in de tumor, organen en overige weefsels onderzocht worden. Voor dit experiment worden op basis van het vorige experiment alleen de geschikte constructen geselecteerd. Er wordt onderzocht wanneer de hoeveelheid nanomedicijn in de tumor maximaal is en wanneer dit in overige weefsels en organen het geval is, optioneel met toediening van het klaringsmiddel. Op deze manier krijgen we inzicht in de verdeling van de nanomedicijnen in tumor en overige weefsels in de tijd en hoe dit (positief) beïnvloed kan worden door toediening van een klaringsmiddel. Op basis van deze resultaten zullen weer alleen de geschikte, meest veelbelovende nanomedicijnen geselecteerd worden voor vervolggexperimenten. Als de ophoping van de nanomedicijnen in de tumor onvoldoende is of als de reactiesnelheid met het klaringsmiddel te langzaam is, zullen deze constructen niet in experiment 3 gebruikt worden. Onvoldoende ophoping in de tumor zal namelijk automatisch leiden tot onvoldoende therapeutische effectiviteit en een te langzame reactie met het klaringsmiddel zal resulteren in een te hoge accumulatie van het nanomedicijn in bijvoorbeeld gezonde weefsels. Daarmee zou de therapeutische index van het met TCO-gemodificeerde nanomedicijn onvoldoende verbeterd zijn ten opzichte van het nanomedicijn zonder TCO-modificatie.

Experiment 3: nanomedicijntherapie in tumordragende muizen

Vervolgens wordt in experiment 3 het therapeutisch effect van de nanomedicijnen onderzocht, waarbij ook de juiste dosering bepaald wordt. Op basis van de resultaten van experiment 2 zal de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie geselecteerd worden en de therapeutische effectiviteit zal worden getest door de remming van de tumorgroei te volgen. De gemeten tumorgroottes zullen verwerkt worden tot tumorgroei-curves. Dé combinatie wordt in maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt. Eventuele toxiciteitseffecten bij deze therapeutische dosis worden binnen experiment 3 geëvalueerd aan de hand van het gewicht van de dieren en bloedwaarden in afgenomen bloedsamples.

Er wordt dus gekeken naar remming van de tumorgroei en toxiciteit. Voor de nanomedicijntherapie in combinatie met toediening van het klaringsmiddel geldt dat de remming van de tumorgroei efficiënt moet zijn en eventuele toxische effecten beperkt moeten blijven.

Experiment 4: histologische evaluatie van de veiligheid van nanomedicijnklaring in muizen

In een laatste fase van het project wordt in experiment 4 de veiligheid van de therapie onderzocht. Dezelfde therapie zal gegeven worden als in experiment 3, maar nu zal met niet-tumordragende muizen gewerkt worden. Overeenkomstig met experiment 3 worden maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt. Met dit experiment kan vastgesteld worden of klaring van de nanomedicijnen veilig is en geen schadelijke effecten heeft voor de verschillende organen, zoals bijvoorbeeld de lever en milt, waar het nanomedicijn naar geklaard wordt. Afvoer van de nanomedicijnen naar de lever en eventuele ophoping in andere organen zou namelijk voor eventuele schadelijke effecten (zoals toxiciteit) op het weefsel kunnen zorgen. Dit dient op verschillende tijdstippen na start van de therapie getest te worden, omdat er enerzijds sprake kan zijn van opbouw van dosis in bepaalde organen en weefsels over tijd en anderzijds omdat organen en weefsels zich in de tijd zouden kunnen herstellen na mogelijk geïnduceerde schade door de nanomedicijnen.

Het onderzoeken van mogelijke schade aan organen en weefsels door toediening van het nanomedicijn kan niet in experiment 3 onderzocht worden, omdat in dat experiment de therapeutische effectiviteit longitudinaal gevolgd wordt. De dieren kunnen dus niet voortijdig opgeofferd worden en de weefsels en organen van deze dieren zijn dus niet beschikbaar voor histologische analyses. Wel kunnen in experiment 3 eventuele toxiciteitseffecten al geëvalueerd worden aan de hand van het gewicht van de dieren en bloedwaarden in afgenomen bloedproefjes.

Omdat we in experiment 4 primair geïnteresseerd zijn in de organen waarnaar de nanomedicijnen geklaard worden en niet in een therapeutisch effect (dit is al bepaald bij experiment 3), wordt gebruik gemaakt van dieren zonder tumor.

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	Testen van nanomedicijnen in muizen

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Testen van nanomedicijnen in muizen

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.

Binnen dierproef 1 zullen 4 experimenten uitgevoerd worden, waarbij de experimentele aanpak en uitkomstparameters afhankelijk zijn van het experiment:

- Experiment 1: bloedkinetiek en biodistributie in muizen
- Experiment 2: tumortargeting en biodistributie in tumordragende muizen
- Experiment 3: nanomedicijntherapie in tumordragende muizen
- Experiment 4: histologische evaluatie van de veiligheid van nanomedicijnklaring in muizen

Experiment 1: bloedkinetiek en biodistributie in muizen

In experiment 1 staat de bepaling van de bloedklaring en TCO-stabiliteit van de nanomedicijnconstructen centraal, optioneel in combinatie met klaring door middel van een tetrazine-klaringsmiddel construct. Verschillende nanomedicijnen, variërend in samenstelling en TCO-modificatiegraad zullen getest worden op hun geschiktheid voor efficiënte klaring uit het bloed. Er zullen muizen zonder tumor gebruikt worden, omdat we in dit experiment primair geïnteresseerd zijn in de bloedkinetiek en tumortargeting in dit experiment nog niet relevant is.

Er zal gekeken worden naar de bloedklaring (en biodistributie aan het eind) van de verschillende (geradiolabelde) constructen. Daarnaast zal de in vivo stabiliteit van de TCO op de nanomedicijnconstructen worden bepaald door bloedmonsters te laten reageren met tetrazine ex vivo. De constructen met een geschikte bloedkinetiek, biodistributie en in vivo stabiliteit zullen in de vervolgentoelatingen worden gebruikt. De radioactiviteit van de gelabelde nanomedicijnen/klaringsmiddelen wordt gemeten in bloed, urine en organen om de biodistributie te bepalen. Het chemotherapeutisch middel dat in het nanomedicijn zat wordt ook geëxtraheerd uit het weefsel. Op het overige deel van het weefsel kan histologische analyse uitgevoerd worden.

Ter verduidelijking en aanvulling van bovenstaande, we willen in dit experiment kijken naar de klaring van het intacte nanomedicijn (liposoom + doxorubicine), en dat doen we door te kijken naar het radiolabel. Daarnaast zullen we ook kijken naar de hoeveelheid vrije doxorubicine in bepaalde weefsels dmv extractie. Mbt de stabiliteit, het gaat ons niet om de stabiliteit van het nanomedicijn als geheel, want die wordt al in vitro getest. Het gaat ons om de stabiliteit van de TCO tag op het nanomedicijn, want daarvan is bekend dat deze in verloop van tijd in circulatie in muizen langzaam wordt gedeactiveerd. Dit kunnen we goed volgen door samples ex vivo te laten reageren met een kleine excess van tetrazine.

Experiment 2: tumor targeting en biodistributie in tumordragende muizen

Alleen de geschikte constructen uit experiment 1 zullen geselecteerd worden voor experiment 2, wat waarschijnlijk een sub-selectie zal zijn van de geteste nanomedicijnconstructen. In experiment 2 zal de tumortargeting en bloedklaring van deze meest veelbelovende constructen onderzocht worden. Daarnaast onderzoeken we in dit experiment de ophoping van de nanomedicijnen en doxorubicine in overige organen op verschillende tijdstippen na injectie. Op deze manier krijgen we inzicht in de verdeling van de nanomedicijnen in tumor en overige weefsels in de tijd en hoe dit positief beïnvloed kan worden door toediening van een klaringsmiddel. Op basis van deze resultaten worden geschikte nanomedicijnconstructen geselecteerd voor experiment 3. Als de tumortargeting van de nanomedicijnen onvoldoende is ten opzichte van de ophoping in overige delen van het lichaam zullen de constructen niet in experiment 3 gebruikt worden.

We zijn primair geïnteresseerd in de concentratie van de verschillende componenten (nanomedicijnen, het eventuele klaringsmiddel en het chemotherapeutische middel dat in het nanomedicijn zit) in de tumor, organen, overige weefsels en het bloed. De radioactiviteit van de gelabelde nanomedicijnen/klaringsmiddelen wordt dus gemeten in tumor, organen, bloed en urine om de biodistributie te bepalen. Het chemotherapeutisch middel dat in het nanomedicijn zat wordt ook geëxtraheerd uit het weefsel. Op het overige deel van het weefsel kan histologische analyse uitgevoerd worden. Op verschillende tijdstippen kunnen ook bloedsamples genomen worden om de concentraties in het bloed te bepalen. Voor experiment 2 en 3 is er gekozen voor het 4T1 tumormodel. Dit tumormodel wordt gegroeid in de borstklier van vrouwelijke muizen. Charrois et al. hebben dit tumormodel ook gebruikt in hun onderzoek naar liposomaal doxorubicine. Hierbij stond het bepalen van de biodistributie en bloedkinetiek van doxorubicine dat verpakt was in verschillende liposomale formulaties centraal. Het doel van dat onderzoek was het bepalen van optimale doseringsschema's en het effect van de grootte en medicijnafgiftesnelheid van de liposomen op de therapeutische effectiviteit en toxische bijeffecten. Ze hebben in dit onderzoek waargenomen dat op ongeveer 24 uur na injectie van de nanomedicijnen de doxorubicineconcentratie in de tumor maximaal was, terwijl pas op een later moment een maximale doxorubicineconcentratie in de poten en huid van de muizen werd waargenomen. Het moment waarop de concentratie van doxorubicine/nanomedicijn in de tumor maximaal is, maar in de poten en huid nog niet, is ideaal voor toediening van het klaringsmiddel. Daarom lijkt dit tumormodel ook zeer geschikt voor dit project. Daarnaast is dit tumormodel een relevant model voor borstkanker, wat een van de kankertypes is waarbij de therapie met bijvoorbeeld Doxil/Caelyx liposomen klinisch toegepast wordt.

Experiment 3: nanomedicijntherapie in tumordragende muizen

Voor de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie zal in dit experiment de therapeutische effectiviteit worden getest door de remming van de tumorgroei te volgen. Dé combinatie wordt in maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt.

In experiment 3 staat de therapeutische effectiviteit centraal, wat vastgesteld wordt door de tumorgrootte over tijd te meten. Deze informatie zal gebruikt worden om tumorgroei-curves te maken. Eventuele toxiciteitseffecten binnen experiment 3 zullen geëvalueerd worden aan de hand van het gewicht van de dieren en bloedwaarden in afgenomen bloedsamples.

Eventuele toxiciteitseffecten die niet op basis van deze gegevens vast te stellen zijn worden in experiment 4 onderzocht. Hierbij gaat het om eventuele schade aan de verschillende weefsels en organen, met name de organen waar de nanomedicijnen naar geklaard worden.

Experiment 4: histologische evaluatie van de veiligheid van nanomedicijnklaring in muizen

Met dit experiment kan vastgesteld worden of klaring van de nanomedicijnen veilig is en geen schadelijke effecten heeft voor de verschillende organen, zoals bijvoorbeeld de lever en milt, waar het nanomedicijn naar geklaard wordt. Afvoer van de nanomedicijnen naar de lever en eventuele ophoping in andere organen zou namelijk voor eventuele schadelijke effecten (zoals toxiciteit) op het weefsel kunnen zorgen.

In dit experiment zal dezelfde therapie gegeven worden als in experiment 3, maar zal nu met niet-tumordragende muizen gewerkt worden.

Overeenkomstig met experiment 3 worden maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt.

In experiment 4 zal de nadruk liggen op histologische analyses van het weefsel, om vast te stellen of klaring van de nanomedicijnen veilig is en geen schadelijke effecten heeft voor de verschillende organen, zoals de lever en milt (waar het nanomedicijn naar geklaard wordt). Afvoer van de nanomedicijnen naar de lever en eventuele ophoping in andere organen zou namelijk voor eventuele schade aan het weefsel kunnen zorgen. Dit dient op verschillende tijdstippen na start van de therapie getest te worden, omdat er enerzijds sprake kan zijn van opbouw van dosis in bepaalde

organen en weefsels in de tijd en anderzijds omdat organen en weefsels zich in de tijd zouden kunnen herstellen na mogelijk geïnduceerde schade door de nanomedicijnen.

Dit onderzoek kan niet uitgevoerd worden op dezelfde dieren als in experiment 3, aangezien bij die dieren het therapeutisch effect longitudinaal gevolgd zal worden en er dus geen weefsels beschikbaar zullen zijn op eerdere tijdstippen na start van de therapie. Omdat we hier primair geïnteresseerd zijn in de organen waarnaar de nanomedicijnen geklaard worden en niet in een therapeutisch effect (dit is al bepaald bij experiment 3), wordt gebruik gemaakt van dieren zonder tumor.

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

Hieronder wordt per experiment de beoogde behandeling en onderbouwing van de gekozen aanpak gegeven:

Experiment 1: bloedkinetiek en biodistributie in muizen

Muizen worden via de staartvene geïnjecteerd (wakker) met de nanomedicijnconstructen (met daarin het chemotherapeutisch middel), mogelijk gevolgd door maximaal twee injecties met klaringsmiddel. Er zullen volgens de NC3Rs richtlijnen in de loop der tijd maximaal acht bloedmonsters genomen worden (wat gewenst is om het effect van het klaringsmiddel goed te kunnen volgen) en geanalyseerd worden (binnen een periode van een week). Na maximaal een week worden de dieren onder anesthesie gebracht, wordt eventueel een laatste bloedmonster genomen via hartpunctie en worden de dieren geëuthanaseerd onder adequate anesthesie. Hierna wordt met behulp van monsters van bloed, urine en organen de biodistributie van het nanomedicijn bepaald. Na euthanasie kan een urinemonster worden genomen en worden een reeks organen uitgenomen.

Experiment 2: tumortargeting en biodistributie in tumordragende muizen

Tumorgroei dmv 4T1 cellen wordt geïnduceerd onder adequate anesthesie. Vervolgens worden de tumoren gegroeid voor maximaal 4 weken, totdat de gewenste tumorgrootte (50-200 mm³) bereikt is. In deze periode wordt de tumorgroei gemonitord door minstens tweemaal per week door de tumorgrootte te meten met een schuifmaat. Vervolgens worden de tumordragende muizen geïnjecteerd (wakker) met een nanomedicijn-construct en optioneel met maximaal tweemaal klaringstof (binnen een periode van een week). In de loop der tijd zullen volgens de NC3Rs richtlijnen maximaal acht bloedmonsters genomen worden (wat gewenst is om het effect van het klaringsmiddel goed te kunnen volgen) en geanalyseerd worden. Na maximaal 7 dagen (waarin bovengenoemde nanomedicijn- en/of klaringsmiddelinjectie en bloedsampling uitgevoerd worden) worden de dieren onder anesthesie gebracht, wordt eventueel een laatste bloedmonster genomen via hartpunctie en worden de dieren geëuthanaseerd onder adequate anesthesie. Hierna wordt met behulp van monsters van bloed, urine en organen de biodistributie van het nanomedicijn en evt klaringsmiddel bepaald. Daarnaast zal de drug worden geëxtraheerd uit geselecteerde weefsels en worden gekwantificeerd.

Experiment 3: nanomedicijntherapie in tumordragende muizen

Tumorgroei wordt geïnduceerd onder adequate anesthesie. Vervolgens worden de tumoren gegroeid voor maximaal 4 weken, totdat de gewenste tumorgrootte (50-200 mm³) bereikt is. In deze periode wordt de tumorgroei gemonitord door minstens tweemaal per week de tumorgrootte te meten met een schuifmaat. Vervolgens worden de tumordragende muizen geïnjecteerd (wakker) met een nanomedicijnconstruct en optioneel met maximaal tweemaal klaringstof (binnen een periode van een week). Er zullen controlegroepen meegenomen worden die in plaats van het nanomedicijn een placebobehandeling krijgen, of alleen met klaringsmiddel geïnjecteerd worden. Vervolgens wordt de tumorgroei gemonitord tot maximaal 4 maanden na nanomedicijn- of placebo-injectie, door minstens tweemaal per week de tumorgrootte te meten met een schuifmaat. Na deze maximaal 4 maanden worden de dieren onder anesthesie gebracht, wordt er eventueel een bloedmonster genomen via hartpunctie en worden de dieren geëuthanaseerd onder adequate anesthesie. Afhankelijk van de resultaten in de voorgaande experimenten zal mogelijk de toxiciteit van de

agentia bepaald worden door voorafgaand aan het experiment en 1 maal per week tijdens het experiment een bloedmonster te nemen volgens de NC3Rs richtlijnen (wakker).

Experiment 4: histologische evaluatie van de veiligheid van nanomedicijnklaring in muizen

De muizen worden geïnjecteerd (wakker) met een nanomedicijn-construct en optioneel met maximaal tweemaal klaringsmiddel. Er zullen controlegroepen meegenomen worden die in plaats van het nanomedicijn een placebobehandeling krijgen, of alleen met klaringsmiddel geïnjecteerd worden. Op verschillende tijdstippen na start van de therapie en tot maximaal 4 maanden na de start van de therapie worden de dieren onder anesthesie gebracht, wordt er eventueel een bloedmonster genomen via hartpunctie en worden de dieren geëuthanaseerd onder adequate anesthesie. De tijdstippen worden gebaseerd op de resultaten in Experiment 3. Mocht er in dat experiment toxiciteit optreden dan zullen de tijdstippen voor en op dat moment liggen om zo de ophoping en schade in relevante organen in de tijd te volgen. Mocht er geen toxiciteit optreden dan zullen de tijdstippen verspreid worden over de gehele duur van het experiment. Afhankelijk van de resultaten in de voorgaande experimenten zal mogelijk de toxiciteit van de agentia bepaald worden door voorafgaand aan het experiment en 1 maal per week tijdens het experiment een bloedmonster te nemen volgens de NC3Rs richtlijnen (wakker). Op de verschillende tijdstippen waarop de dieren zijn opgeofferd zal het effect van ophoping van nanomedicijnen op het weefsel histologisch onderzocht worden.

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

In de eerste fase van het onderzoek worden de chemisch reactieve (actief te klaren) nanomedicijnen en klaringsmiddelen uitgebreid in vitro gekarakteriseerd en getest, om zo de reactiviteit en stabiliteit in buffer en serum vast te stellen. Na deze in vitro tests, waarvoor geen proefdieren benodigd zijn, selecteren we alleen de geschikte nanomedicijnen en klaringsmiddelen voor de dierexperimenten. Als de nanomedicijnen niet stabiel genoeg zijn of als de TCO onvoldoende reactief is met het tetrazine derivaat worden de nanomedicijnen niet geselecteerd voor vervollexperimenten. Alleen de meest veelbelovende constructen zullen dus in een dierexperiment getest worden.

In een volgende fase van het onderzoek (experiment 1) wordt de bloedkinetiek van de nanomedicijnen en klaringsmiddelen onderzocht. Op basis van die experimenten zullen weer alleen de veelbelovende constructen geselecteerd worden voor vervollexperimenten, wat waarschijnlijk een sub-selectie zal zijn van de geteste nanomedicijn-constructen. Belangrijke criteria hierbij zijn dat de nanomedicijnen zonder toediening van het klaringsmiddel voldoende lang in de circulatie moeten blijven, dat de nanomedicijnen die TCO bevatten na toediening van het klaringsmiddel voldoende snel uit de bloedbaan geklaard moeten worden en dat de TCO van deze nanomedicijnen voldoende stabiel moet zijn in vivo.

In een volgende stap (experiment 2) wordt de ophoping van de chemotherapeutische nanomedicijnen in de tumor, organen en overige weefsels onderzocht. Er wordt onderzocht wanneer de hoeveelheid nanomedicijn in de tumor maximaal is en wanneer dit in overige weefsels en organen het geval is, optioneel met toediening van het klaringsmiddel. Op basis van deze resultaten zullen weer alleen de geschikte, meest veelbelovende nanomedicijnen geselecteerd worden voor vervollexperimenten. Als de ophoping van de nanomedicijnen in de tumor onvoldoende is of als de reactiesnelheid met het klaringsmiddel te langzaam is, zullen deze constructen niet in experiment 3 gebruikt worden. Onvoldoende ophoping in de tumor zal namelijk automatisch leiden tot onvoldoende therapeutische effectiviteit en een te langzame reactie met het klaringsmiddel zal resulteren in te veel ophoping van het nanomedicijn in bijvoorbeeld gezonde weefsels. Daarmee zou de therapeutische index van het met TCO-gemodificeerde nanomedicijn onvoldoende verbeterd zijn ten opzichte van het nanomedicijn zonder TCO-modificatie.

Op basis van de resultaten van experiment 2 zal de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie geselecteerd worden en in de volgende fase van het onderzoek (experiment 3) zal de therapeutische effectiviteit worden getest door de remming van de tumorgroei te volgen. Voor experiment 4 wordt overeenkomstig met experiment 3 alleen de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie uit de eerdere experimenten gebruikt.

Door deze gefaseerde projectopzet, met tussentijdse evaluaties en selecties wordt het aantal benodigde dieren tot een minimum beperkt. Er wordt per experiment een statistische analyse uitgevoerd om het aantal benodigde proefdieren te berekenen. Hierin zal o.a. de verwachte spreiding op de uitleesparameters, het beoogd effect en de gewenste power meegenomen worden. Hierdoor wordt voorkomen dat er meer proefdieren gebruikt zouden worden dan noodzakelijk. Voor het bepalen van de groepsgroottes wordt de sample size calculation tool van de [REDACTED] gebruikt [REDACTED]. Er zal rekening gehouden worden met een mogelijk klein uitvalspercentage door eventuele foutieve injectie van het nanomedicijn of eventueel klaringsmiddel.

B. The animals

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

Diersoort en sexe:

Immunocompetente, vrouwelijke Balb/c muizen.

Voor dit project is gekozen voor het 4T1 tumormodel (in experiment 2 en 3). Dit is een muis tumormodel en kan dus alleen gegroeid worden in muizen. Het is een borstkliercarcinoom en daarom dient het ook gegroeid te worden in de borstklier van vrouwelijke Balb/c muizen. Vanwege deze redenen komt geen andere diersoort in aanmerking. De reden dat voor dit tumormodel gekozen is, is dat Charrois et al. dit tumormodel ook gebruikt hebben in hun onderzoek naar liposomaal doxorubicine. Hierbij stond het bepalen van de biodistributie en bloedkinetiek van doxorubicine dat verpakt was in verschillende liposomale formulaties centraal. Ze hebben in dit onderzoek waargenomen dat op ongeveer 24 uur na injectie van de nanomedicijnen de doxorubicineconcentratie in de tumor maximaal was, terwijl pas op een later moment een maximale doxorubicineconcentratie in de poten en huid van de muizen werd waargenomen. Het moment waarop de concentratie van doxorubicine/nanomedicijn in de tumor maximaal is, maar in de poten en huid nog niet, is ideaal voor toediening van het klaringsmiddel. Daarom lijkt dit tumormodel zeer geschikt voor dit project. Daarnaast is dit tumormodel een relevant model voor borstkanker, wat een van de kankertypes is waarbij de therapie met bijvoorbeeld Doxil/Caelyx liposomen klinisch toegepast wordt. Van andere tumortypes is grotendeels onbekend wat de farmacokinetiek van de nanomedicijnen en verdeling over tumor en andere organen/weefsels zouden zijn, omdat dit in minder detail is uitgezocht. Het is dus ook onbekend of deze tumormodellen geschikt zouden zijn om de nanomedicijne+klaringsmiddel therapie mee te testen. Dit zou eerst uitgezocht moeten worden in aparte dierexperimenten, wat niet gewenst is, omdat hiervoor extra dieren nodig zouden zijn.

In experiment 1 en 4 dienen ook dezelfde soort vrouwelijke muizen gebruikt te worden als in experiment 2 en 3, zodat er zo weinig mogelijk verschillen zijn in fysiologie tussen de dieren. Dit zou namelijk de farmacokinetiek van de nanomedicijnen en klaringsmiddelen kunnen beïnvloeden. Het is belangrijk om hier rekening mee te houden, omdat de nanomedicijnen en klaringsmiddelen die gebruikt worden in experiment 2 en 3 geselecteerd worden op basis van de resultaten van experiment 1. Daarnaast worden de bevindingen in experiment 4 worden gekoppeld aan de bevindingen in experiment 3.

Herkomst:

Leverancier met geregistreerde fok/afleververgunning

Geschatte aantallen:

Experiment 1:

Er zullen maximaal 12 nanomedicijntypen (variërend in samenstelling en TCO-modificatiegraad) onderzocht worden. De TCO-modificatiegraad heeft mogelijk invloed op hoe efficiënt de nanomedicijnen geklaard kunnen worden door middel van een klaringsmiddel. De samenstelling kan daarnaast invloed hebben op de bloedkinetiek. Er wordt begonnen met een samenstelling die vergelijkbaar is met die van Doxil/Caelyx (maar dan met

eventuele TCO-modificatie) en indien nodig wordt deze aangepast. Er wordt gestopt met het experiment als de beste combinatie van nanomedicijn en klaringsmiddel gevonden is (zie projectvoorstel).

Er wordt verwacht dat maximaal 5 dieren per groep nodig zullen zijn, wat in vergelijkbare bloedkinetiek/biodistributie studies voldoende bleek te zijn. Dit aantal wordt gebaseerd op een statistische analyse die uitgevoerd wordt om het aantal benodigde proefdieren te berekenen (zie punt A: experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters). Hierin zal o.a. de verwachte spreiding op de uitleesparameters, het beoogd effect en de gewenste power meegenomen worden. Tevens zal er rekening gehouden worden met een mogelijk klein uitvalspercentage door eventuele foutieve injectie van het nanomedicijn of eventueel klaringsmiddel. Dit zal gedaan worden door de volgende formule te hanteren, waarin a het uiteindelijke aantal benodigde dieren is en x de fractie uitval: $(a-x*a)=5$. Indien de uitval dus bijvoorbeeld 10% zou zijn, komt het aantal dieren dus op $a=5.6$, wat afgerond 6 dieren zijn. Met dit uitval meegenomen wordt verwacht dat er voor de 12 nanomedicijnen dus maximaal $(6*12=)$ 72 muizen nodig zijn.

Experiment 2:

Na selectie van de meest veelbelovende constructen uit experiment 1 testen we in dit experiment de volgende dingen: 2 TCO-modificatieniveaus van de nanomedicijnen, maximaal 3 variaties in het bewerkstelligen van de klaring van de nanomedicijnen en maximaal 4 verschillende tijdstippen van opofferen om op dat moment de biodistributie te bepalen.

Er wordt verwacht dat maximaal 5 dieren per groep nodig zullen zijn, wat in vergelijkbare biodistributie studies voldoende bleek te zijn. Dit aantal wordt gebaseerd op een statistische analyse uitgevoerd om het aantal benodigde proefdieren te berekenen. Hierin zal o.a. de verwachte spreiding op de uitleesparameters, het beoogd effect en de gewenste power meegenomen worden. Tevens zal er rekening gehouden worden met een mogelijk klein uitvalspercentage door eventuele foutieve injectie van het nanomedicijn of eventueel klaringsmiddel en eventuele problemen met tumorgroei, op dezelfde manier als beschreven voor experiment 1. Met deze uitval meegenomen en de verschillende hierboven beschreven experimentele groepen wordt verwacht dat er maximaal $(2*3*4 \text{ groepen} * 6 \text{ dieren (per groep 5 + een uitvalspercentage)})=$ 144 muizen nodig zijn.

Experiment 3:

In experiment 3 zal voor de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie de therapeutische effectiviteit worden getest door de remming van de tumorgroei te volgen. Dé combinatie wordt in maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt. Daarmee komt het totaal op $(3*2*2+1+1=)$ 14 groepen. Voor deze therapiestudie verwachten we maximaal 15 dieren per groep nodig te hebben, o.a. vanwege de verwachte grote spreiding in tumor respons, met daarin al meegenomen de mogelijk uitval door eventuele foutieve injectie van nanomedicijn of klaringsmiddel en problemen met tumorgroei (zoals achterblijvende groei). Hiermee komt het totaal voor experiment 3 op maximaal $(14 \text{ groepen} * 15 \text{ dieren})=$ 210 muizen.

Experiment 4:

In experiment 4 wordt voor (maximaal) dezelfde groepen als beschreven in experiment 3 histologisch onderzoek uitgevoerd op de weefsels op bepaalde tijden na start van therapie. Dit onderzoek kan niet uitgevoerd worden op dezelfde dieren als in experiment 3 omdat in die groep het therapeutisch effect longitudinaal gevolgd zal worden. Overeenkomstig met experiment 3 worden maximaal 3 doseringen getest, waarbij voor elke dosering het nanomedicijn met of zonder TCO-modificatie en met of zonder inspuiten van het klaringsmiddel getest wordt. Daarnaast worden de volgende controlegroepen getest: een groep die placebobehandeling krijgt en een groep die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgt. Het aantal groepen komt hiermee op 14 $(3*2*2+1+1)$. Omdat dit een kwalitatieve analyse betreft, waarop geen statistiek wordt toegepast verwachten we hier aan 5 dieren per groep voldoende te hebben (met eventuele uitval door foutieve injecties meegenomen).

Hiermee komt het totaal voor experiment 4 op maximaal $(14 \text{ groepen} * 5 \text{ dieren})=$ 70 muizen.

Het totaal aantal muizen voor deze aanvraag komt daarmee op 496 muizen.

Levensstadia: de leeftijd van de muizen ten tijde van bestelling is 6-8 weken. Dit is een gebruikelijke leeftijd voor dit tumormodel (zie het artikel: Pulaski, B. A. and Ostrand-Rosenberg, S. 2001. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. Current Protocols in Immunology. 39:20.2:20.2.1–20.2.16.). Deze leeftijd komt ook overeen met de leeftijd die door Charrois et al. gebruikt is in hun studies met de 4T1 tumormodellen. Dit is een zeer relevant tumormodel voor dit project (zie eerdere beschrijving bij punt A; experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters). Door dezelfde leeftijd te kiezen als gebruikt in de studies van Charrois et al. is er ook zo weinig mogelijk verschil in fysiologie (en daardoor mogelijk ook in de farmacokinetiek van geïnjecteerde nanomedicijnen) tussen dit project en hun studies en kunnen resultaten beter getransleerd en vergeleken worden. Bij experiment 1 en 4 worden geen tumordragende muizen gebruikt, maar zal ook een bestelleeftijd van 6-8 weken gebruikt worden, zodat de dieren die gebruikt worden in deze experiment ook ongeveer dezelfde fysiologische eigenschappen zullen hebben als de dieren van experiment 2 en 3. De uiteindelijke maximale leeftijd die de dieren zullen bereiken is afhankelijk van de experimentele condities zoals die beschreven staan onder punt A (Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Balb/C mice	Leverancier met geregistreerde fok/afleververgunning	496	6-8 weeks

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.

Vervanging:

In een eerste fase van het onderzoek worden de nanomedicijnen en klaringsmiddelen gesynthetiseerd, en uitgebreid in vitro gekarakteriseerd en getest, om zo de reactiviteit en stabiliteit vast te stellen. Hierbij worden proeven gedaan in buffer met fysiologische eigenschappen en in serum, om de condities in het bloed na te bootsen. Op basis van deze metingen kan vóór de dierexperimenten al een voorselectie gemaakt worden van alleen de geschikte en veelbelovende constructen.

Indien men kanker effectief wil behandelen met de combinatie van het nanomedicijn en het klaringsmiddel, is het vervolgens belangrijk om te weten hoe de verschillende componenten zich in het lichaam gedragen. In dit project worden nieuw ontwikkelde nanomedicijnen en klaringsmiddelen onderzocht, waarvan nog onbekend is welk farmacokinetisch gedrag ze zullen vertonen, en hoe effectief de klaring van het nanomedicijn in vivo zal plaatsvinden. Daarom moet de bloedkinetiek, de verdeling over het lichaam, de therapeutische effectiviteit en de eventuele toxiciteit onderzocht worden. Deze factoren zijn afhankelijk van complexe processen die afhankelijk zijn van o.a. de fysiologie en het micromilieu van de tumor. Dit kan niet nagebootst worden in het laboratorium of met computersimulaties. Aangezien deze nanomedicijnen en klaringsmiddelen vanuit medische en ethische overwegingen niet direct in patiënten getest kunnen worden, komt alleen een diermodel in aanmerking.

Vermindering:

Vooraf zijn de nanomedicijnen en klaringsmiddelen uitgebreid in vitro getest op stabiliteit en reactiviteit. Alleen de nanomedicijnen en klaringsmiddelen waarvan gebleken is dat ze stabiel en voldoende reactief zijn worden getest in de dierexperimenten.

Van de geselecteerde nanomedicijnen en klaringsmiddelen wordt in een eerste experiment de bloedklaring en stabiliteit bepaald. De nanomedicijnen die getest worden verschillen in samenstelling en TCO-modificatiegraad. De TCO-modificatiegraad heeft mogelijk invloed op hoe efficiënt de nanomedicijnen geklaard kunnen worden door middel van een klaringsmiddel. De samenstelling kan daarnaast invloed hebben op de bloedkinetiek. Er wordt begonnen met een samenstelling die vergelijkbaar is met die van Doxil/Caelyx (maar dan met eventuele TCO-modificatie) en indien nodig wordt deze aangepast, waarbij in experiment 1 maximaal 12 formulaties getest zullen worden. Op basis van de resultaten van experiment 1 zullen alleen de veelbelovende constructen geselecteerd worden voor vervolgexperimenten, wat waarschijnlijk een sub-selectie zal zijn van de geteste nanomedicijn-constructen. Er wordt gestopt met experiment 1 als de beste combinatie van nanomedicijnen en klaringsmiddelen gevonden is. In experiment 2 zal de bloedklaring en accumulatie van de nanomedicijnconstructen en klaringsmiddelen in tumor en organen bepaald worden. Als de ophoping van de nanomedicijnen in de tumor onvoldoende is of als de reactiesnelheid met het klaringsmiddel te langzaam is, zullen deze constructen niet in experiment 3 gebruikt worden. Onvoldoende ophoping in de tumor zal namelijk automatisch leiden tot onvoldoende therapeutische effectiviteit en een te langzame reactie met het klaringsmiddel zal resulteren in een te hoge accumulatie van het nanomedicijn in bijvoorbeeld gezonde weefsels.

In experiment 3 en 4 wordt op basis van experiment 1 en 2 de optimale nanomedicijn+klaringsmiddel combinatie geselecteerd en wordt de therapeutische effectiviteit en veiligheid getest.

Door deze opzet, met tussentijdse evaluaties van geschiktheid van de nanomedicijnen, klaringsmiddelen, of combinatie daarvan, wordt het aantal benodigde proefdieren zoveel mogelijk beperkt.

Naast deze gefaseerde proefopzet zullen waar mogelijk per proefdier zowel de biodistributie van het nanomedicijn zelf (door middel van weefselextracties), het klaringsmiddel en het chemotherapeutische middel bepaald worden. Doordat we voor deze verschillende agentia geen aparte proefdieren bestellen zal het totaal aantal dieren zoveel mogelijk beperkt worden. Dit zal niet leiden tot extra ongerief, omdat kwantificatie van de concentraties van de moleculen een ex vivo analyse betreft en deze verschillende moleculen ongeacht die analyse sowieso in 1 dier geïnjecteerd zouden moeten worden.

Tot slot wordt een statistische analyse uitgevoerd om het aantal benodigde proefdieren te berekenen. Hierin zal o.a. de verwachte spreiding op de uitleesparameters, het beoogd effect en de gewenste power meegenomen worden. Hierdoor wordt voorkomen dat er meer proefdieren gebruikt zouden worden dan noodzakelijk.

Verfijning:

Diermodel en tumormodel

Er is gekozen om muizen te gebruiken in dit project. De effectiviteit van een breed scala aan nanomedicijnen en chemotherapeutische middelen is getest in verschillende muismodellen van kanker. Deze tumormodellen kunnen op een gecontroleerde manier geïnduceerd worden en de tumoren kunnen vaak op een goed controleerbare manier gegroeid worden. Van verschillende tumormodellen in muizen is aangetoond dat ze ook relevant zijn in vergelijking met humane tumoren en gelijke eigenschappen vertonen.

Daarnaast zal in dit project in experiment 2 en 3 het 4T1 tumormodel gebruik worden. Dit is een muis tumormodel en kan dus alleen gegroeid worden in muizen. Het is een borstklier carcinoom en daarom dient het ook gegroeid te worden in de borstklier van vrouwelijke Balb/c muizen. Charrois et al. heeft dit tumormodel ook gebruikt in een aantal onderzoeken over het nanomedicijn liposomaal doxorubicine (Zoals beschreven onder punt B. 'De dieren'). De in hun onderzoek geobserveerde verdeling van de nanomedicijnen over tumor en organen geeft aan dat dit tumormodel uitermate geschikt is voor dit project, omdat er een moment is waarop de concentratie van doxorubicine/nanomedicijn in de tumor maximaal is, maar in de poten en huid nog niet. Dit is een ideaal moment voor toediening van het klaringsmiddel. Daarnaast is dit tumormodel een relevant model voor borstkanker, wat een van de kankertypes is waarbij de therapie met bijvoorbeeld liposomaal doxorubicine klinisch toegepast wordt. Van andere tumortypes is grotendeels onbekend wat de farmacokinetiek van de nanomedicijnen en verdeling over tumor en andere organen/weefsels zouden zijn, omdat dit in minder detail is uitgezocht. Het is dus ook onbekend of deze tumormodellen geschikt zouden zijn om de nanomedicijn+klaringsmiddel therapie in te testen. Dit zou eerst uitgezocht moeten worden in aparte dierexperimenten, wat niet gewenst is omdat dit extra dierexperimenten zou vereisen.

In experiment 1 ligt de nadruk op de bloedkinetiek en biodistributie van de nanomedicijnen en nog niet op tumortargeting. Daarom is voor dit experiment ervoor gekozen om niet-tumordragende muizen te gebruiken. Omdat therapeutische effectiviteit al onderzocht is in experiment 3, gebruiken we daarnaast ook in experiment 4 muizen zonder tumor. Doordat tumorgroei achterwege gelaten wordt bij experiment 1 en 4, omdat dat niet noodzakelijk is om de vragen die centraal staan in die experimenten te beantwoorden, is er geen ongerief dat gerelateerd is aan tumorgroei.

Anesthesie

Er wordt adequate anesthesie toegepast bij de experimentele handelingen waarvoor dit vereist is en daarnaast wordt adequate pijnstilling gegeven indien de dieren tekenen van pijn vertonen. Hiertoe zullen de dieren nauwlettend gemonitord worden. Hiermee wordt het ongerief voor het dier zoveel mogelijk beperkt.

Bloedsampling

Bloedsampling wordt uitgevoerd volgens de NC3Rs richtlijnen, waardoor het ongerief zoveel mogelijk beperkt wordt.

Huisvesting

De dieren worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU en er zal kooiverrijking gegeven worden.

Bekwaamheid

De betrokkenen bij dit project hebben ruime ervaring met bloedkinetiek/biodistributie studies in muizen, waardoor verwacht wordt dat betrouwbare resultaten verkregen kunnen worden.

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

De volgende maatregelen zullen getroffen worden om de negatieve gevolgen van de proeven voor het welzijn van het dier te beperken:

- Er wordt adequate anesthesie toegepast bij de experimentele handelingen waarvoor dit vereist is en daarnaast wordt adequate pijnstilling gegeven indien de dieren tekenen van pijn vertonen. Hiermee wordt het ongerief voor het dier zoveel mogelijk beperkt.

- De dieren zullen nauwlettend gemonitord worden. Uitgangspunt hierbij is de code of practice voor kankeronderzoek. Er worden humane eindpunten gedefinieerd gebaseerd op een aantal klinische verschijnselen, waarop de dieren regelmatig worden gescoord. Deze scoring wordt gedaan op basis van een welzijnsscoringslijst. Hiermee wordt ook ongerief door tumorgroei en metastasen zoveel mogelijk beperkt.

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.

nvt

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 I.

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

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

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

Inoculatie van tumorcellen wordt uitgevoerd onder adequate anesthesie. Bij het uitvoeren van een hartpunctie en bij euthanasie door middel van weefsel-perfusie wordt ook anesthesie toegepast. Daarnaast wordt adequate pijnstilling gegeven als de dieren tekenen van pijn vertonen. Pijnverlichtingsmethoden zullen volgens de richtlijnen worden toegepast.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In de geplande experimenten (1 tot en met 4) zullen chemotherapeutische nanomedicijnen en eventueel klaringsmiddelen toegediend worden in wakkere toestand. Daarnaast zullen er bloedafnames gedaan worden. Voor de combinatie van deze handelingen wordt volgens matig ongerief verwacht (gebaseerd op directive 2013/36/eu).

De gebruikte chemotherapeutische middelen kunnen mogelijk toxische bijwerkingen geven, zoals maagdarmklachten en bijgevolg gewichtsverlies, huidirritatie, haaruitval, levernecrose, cardiomyopathie, en nierbeschadiging. Deze effecten worden voor de beschreven medicijnafgiftesystemen bij een eenmalige, sub-letale dosis echter maar in beperkte mate verwacht.

In experiment 2 en 3, waarin tumordragende muizen gebruikt worden, wordt daarnaast ongerief verwacht door injectie en groei van de 4T1 tumoren. Het 4T1 tumormodel is een model dat kan metastaseren naar verschillende organen. Er is gerapporteerd dat in 2 tot 3 weken zich metastasen naar lymfeknopen, longen en lever kunnen ontwikkelen, in 86%, 79% en 20% van de dieren, respectievelijk. Op 4 a 5 weken na

tumorcelinfectie kan het percentage metastasen naar longen, lever en nu ook brein toenemen naar 91%, 82% en 36%, respectievelijk. In experiment 2 zullen de dieren echter maar relatief kort nadat de tumor de gewenste grootte bereikt nog in experiment zijn. Daarom wordt bij deze dieren verwacht dat ze geen extra ongerief door tumorgroei of door het optreden van metastasen zullen hebben. Bij experiment 3 zijn de dieren gedurende langere tijd in experiment, omdat in dit experiment naar tumor therapie gekeken wordt. Een deel van deze dieren krijgt ook een placebobehandeling of alleen een injectie van het klaringsmiddel, waardoor tumorgroei niet geremd wordt. Doordat er humane eindpunten toegepast worden, wordt voorkomen dat er sprake is van een dodelijke voortschrijdende ziekte met een langdurige matige vorm van pijn, waardoor er geen overschrijding van matig ongerief zal zijn. Er zal regelmatige monitoring van de tumorgroei plaatsvinden door het meten van de tumorgrootte met een schuifmaat, wat ook ongerief veroorzaakt.

Explain why these effects may emerge.

De chemotherapeutische middelen die gebruikt worden kunnen cytotoxische effecten met zich meebrengen, wat tot bijwerkingen kan leiden. Er wordt echter verwacht dat deze effecten bij de experimentele condities van dit project maar beperkt aanwezig zullen zijn. Om mogelijke bijwerkingen te minimaliseren wordt er slechts 1 injectie gegeven en de meeste bijwerkingen zouden optreden bij een behandeling in kuurvorm of bij hoge doseringen. Daarnaast zitten de chemotherapeutische middelen verpakt zit in een medicijnafgiftesysteem, waardoor een eventueel toxisch effect van het vrije chemotherapeutische middel maar in beperkte mate aanwezig is aangezien het langzaam vrijkomt (met name op de plek van de tumor). Bij experiment 3 kan er uitzaaiing van tumorcellen naar andere organen zijn, wat vooral verwacht wordt als de therapie geen effect heeft of bij de controlegroepen. Dit wordt in experiment 2 maar in beperkte mate verwacht, omdat de dieren relatief kort in experiment zijn.

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

De kans op bijwerkingen door eventuele cytotoxische effecten van de chemotherapeutische middelen wordt geminimaliseerd door de keuze voor een eenmalige injectie van de nanomedicijnen. Daarnaast worden de dieren nauwlettend gemonitord en indien noodzakelijk (aan de hand van de humane eindpunten) geëuthanaseerd. Zo wordt bij de tumordragende dieren voorkomen dat er sprake is van een voortschrijdende dodelijke ziekte en blijft het ongerief door eventuele metastasen beperkt.

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.

De humane eindpunten worden gebaseerd op de volgende algemene klinische verschijnselen:

1. Gedrag (scoren op reactie op prikkels, Back arch, twitch, wincing en white; en scoren op de mouse grimace scale)
2. Houding

3. Gang/ mobiliteit
4. Verzorgingstoestand
5. huid/faeces
6. respiratie/ademhaling
7. hydratatiestoestand/uitdrogingsverschijnselen
8. kleur slijmvliezen en extremiteiten
9. tumorgrootte
10. open wonden
11. Ontsteking/Ulceratie van de huid (ook van de huid van de tumor)
12. andere in het oog springende afwijking

Deze klinische verschijnselen worden als volgt gescoord: 0= normaal, 1= geringe afwijking, 2= matige afwijking, 3= ernstige afwijking. Deze scoring wordt gedaan op basis van een welzijnsscoringslijst, die aan het werkprotocol wordt toegevoegd. Euthanasie zal worden toegepast indien op enig moment score 3 wordt bereikt, omdat het belang van de proef dan niet meer opweegt tegen het ongerief van het dier en de meetresultaten in het geval van deze score niet meer als betrouwbaar kunnen worden geacht. Daarnaast wordt euthanasie toegepast als een totale score van 6 (uit een combinatie van geringe en/of matige afwijkingen) bereikt wordt. In dat geval wordt de optelsom aan ongerief ook dusdanig geacht dat het belang van de proef hiertegen niet meer opweegt en de meetresultaten in het geval van deze score niet meer als betrouwbaar kunnen worden geacht.

Daarnaast wordt euthanasie toegepast indien één van de volgende punten zich zou voor doen:

- gewichtsverlies > 20 % (met in achtname van tumor gewicht)
- Tumorgrootte > 1.5 cm³.
- Automutilatie

Indicate the likely incidence.

Verwacht wordt dat deze criteria met name gehaald zouden kunnen worden in experiment 3, waarin de dieren tumordragend zijn en gedurende langere tijd gevolgd worden.

Dit geldt met name voor de dieren die behandeld worden met de placebobehandeling, of die alleen het klaringsmiddel toegediend krijgen. Het gaat hier om 2 groepen van in totaal maximaal 30 dieren voor experiment 3. Bij de overige 180 dieren wordt namelijk tumorgroei beperkt door het therapeutisch effect van het nanomedicijn. Mogelijk kan bij de dieren die behandeling ondergaan bij een bepaald percentage van de dieren de behandeling onvoldoende aanslaan. We schatten dat dit bij 20 procent van deze 180 dieren zou kunnen gebeuren, wat neerkomt op 36 dieren. Ondanks dat in dit project geen behandeling in kuurvorm gegeven wordt, zouden er in een enkel geval eventueel acute bijwerkingen van de nanomedicijnen zich voor kunnen doen. Dit zou bijvoorbeeld beïnvloed kunnen worden door de klaring van de nanomedicijnen naar de lever. Het is moeilijk op voorhand te voorspellen in welke mate dit zal leiden tot het behalen van de criteria voor humane eindpunten. Er wordt geschat dat in vijf procent van de dieren die met nanomedicijnen worden geïnjecteerd deze criteria gehaald kunnen worden. Het aantal dieren dat met nanomedicijnen wordt geïnjecteerd is 72+144+180+60 (dit zijn alle dieren van experiment 1 tot en met 4, min de dieren die een placebobehandeling krijgen of alleen injectie van het klaringsmiddel). Van de 180 dieren van experiment 3 is al aangegeven dat bij een percentage van 20 procent (36 dieren) de behandeling mogelijk niet aan zou kunnen slaan. Vijf procent van de resterende dieren zou dus neerkomen op $(0.05 * (72+144+144+60)) = 21$ dieren.

Deze aantallen bij elkaar opgeteld geeft een schatting van $(30+36+21) = 87$ dieren waarbij deze criteria gehaald zouden kunnen worden.

Het totale percentage van de dieren die de beschreven criteria kunnen halen komt daarmee op $(100 \cdot 87 / 496 =)$ 18%.

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).

Het cumulatief ongerief wordt ingeschat op matig, op basis van de bovengenoemde negatieve effecten op het welzijn van het dier.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

De weefsels van de dieren zijn nodig om de biodistributie van de nanomedicijnen en klaringsmiddelen te bepalen.

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2016-0002
2. Titel van het project: Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische index van chemotherapie
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van reactieve nanomedicijnen voor effectieve kankertherapie met minder bijwerkingen
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 19-01-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-02-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-02-2016 tot 09-03-2016
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 09-03-2016
 - advies aan CCD: 31-03-2016
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: 08-02-2016
 - Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-3.3 De uitspraak 'Dit heeft een negatieve invloed op het klinisch resultaat' lijkt het intrappen van een open deur. De commissie adviseert u deze zin weg te laten.

-3.4.3 Er wordt gestopt met het experiment als de beste combinatie van nanomedicijnen en klaringsmiddelen gevonden is. Hoe weten de onderzoekers wat de beste combinatie is zonder ze eerst allemaal te testen?

Description of Animal Procedures:

-A1, experiment 2: hier hoort de toelichting voor de keuze voor 4T1 als tumormodel.

- Datum antwoord: 09-03-2016
- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-3.3 Deze zin hebben we nu weggelaten.

-3.4.3 Dit is inderdaad niet mogelijk. We hebben deze zin nu weggelaten.

Description of Animal Procedures:

-A1 Deze toelichting is nu verplaatst van 3.4.3 naar A1, experiment 2.

- 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.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'te bepalen of nanomedicijntherapie gecombineerd met toediening van een klaringsmiddel gebruikt kan worden om bijwerkingen van chemotherapie te verminderen, terwijl de therapeutische effectiviteit minimaal beïnvloed wordt'. De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken of het toedienen van een klaringsmiddel op een bepaalde tijd na Doxil/Caelyx therapie leidt tot een vergelijkbare of betere antitumor activiteit in een muismodel voor borstkanker, waarbij ongewenste afgifte van chemotherapie in overige delen van het lichaam beperkt kan worden. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectieve(re) chemotherapieën met minder bijwerkingen voor mensen met borsttumoren en mogelijk ook

andere typen solide tumoren. Belangrijke toxische bijwerkingen van de huidige behandeling met Doxil/Caelyx zijn ontstekingen aan handen en voeten en in de mond. Deze bijwerkingen ontstaan doordat het nanomedicijn zich uiteindelijk op deze plaatsen ophoopt, en vormen bij de helft van de patiënten een beperkende factor voor het geven van deze chemotherapie. Solide tumoren komen veel voor in de bevolking. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van effectieve(re) chemotherapieën met minder bijwerkingen voor mensen met verschillende typen tumoren, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen. Om deze redenen acht de commissie dit onderzoek van substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De samenwerkingspartners zijn experts op het gebied van de productie van nanomedicijnen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de bruikbaarheid van nanomedicijntherapie in combinatie met een klaringsmiddel en de effectiviteit en toxiciteit van deze combinatietherapie bij muizen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de groeiende tumor en de behandeling daarvan. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde bloedafnames, de i.v. injecties met nanomedicijnen of klaringsmiddel (maximaal tweemaal), de injectie van de tumorcellen in de borstklier onder anesthesie, het meten van de tumorgrootte met een schuifmaat (minstens tweemaal per week), en het doden onder anesthesie in als licht. De combinatie van deze handelingen kan tot matig ongerief leiden. Het ongerief als gevolg van de groeiende tumor schat de commissie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Een ziekte waarbij meerdere organen zijn betrokken kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen. De onderdelen van het project die *in vitro* bestudeerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 496 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, zodat de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Er wordt adequate anesthesie toegepast bij de experimentele handelingen waarvoor dit vereist is, en de onderzoekers zullen eventuele overige pijn bij de dieren zoveel mogelijk

bestrijden door pijnstilling te geven. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in het toepassen van een klaringsmiddel om ophoping van doxorubicine/nanomedicijn in gezonde organen te verminderen met behoud van anti-tumor effectiviteit in een muismodel voor borstkanker. Het is aannemelijk dat deze resultaten zullen bijdragen aan het ontwikkelen van effectievere chemotherapieën met nanomedicijnen voor patiënten met borsttumoren door het verminderen van toxische bijwerkingen. Op termijn zouden de resultaten ook toegepast kunnen worden bij de behandeling van andere solide tumoren. Het belang van meer inzicht in de mogelijke toepassing van een klaringsmiddel om toxische bijwerkingen van nanomedicijnen te beperken en de ontwikkeling van effectievere chemotherapieën voor (borst)kanker acht de DEC substantieel, gezien de prevalentie van (borst)kanker in de bevolking en de frequentie van het optreden van bijwerkingen die beperkingen opleggen aan de dosis en duur van de behandeling. De resultaten uit dit onderzoek kunnen op korte termijn vertaald worden naar klinische toepassingen bij borstkanker.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de tumorgroei of de toediening van het nanomedicijn in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Instantie voor Dierenwelzijn

Postbus 9101

6500 HB (628) NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002016499

Bijlagen

2

Datum 31 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016499. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. 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: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB Nijmegen NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St. Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Post-Doctoraal onderzoeker
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB (628) NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

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 mei 2016
Geplande einddatum: 1 mei 2021
Titel project: Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische ind
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van reactieve nanomedicijnen voor effectieve kankertherapie met minder
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: Melding Machtiging
 DEC-advies

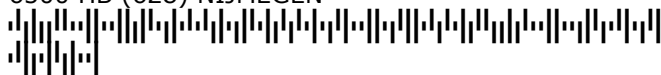
Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 31 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor Dierenwelzijn
Radboud universitair medisch centrum
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB (628) NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016499
Bijlagen
2

Datum 31 maart 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 31 maart 2016
Vervaldatum: 30 april 2016
Factuurnummer: 16700499
Ordernummer: 040823-461220/2016-0002/[REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016499	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Instantie voor Dierenwelzijn

Postbus 9101,
6500 HB (628) NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002016499
Bijlagen

1

Datum 24 mei 2016
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 31 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische index van chemotherapie" met aanvraagnummer AVD103002016499. 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). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. Omdat in uw aanvraag de beslisriteria van de go/no-go momenten niet in detail voorafgaand het begin van het project bekend zijn, stelt de CCD als voorwaarde dat de beslissing om verder te gaan met een vervolgexperiment moet worden afgestemd met de IvD. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische index van chemotherapie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 mei 2016 tot en met 1 mei 2021. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 31 maart 2016. 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. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. In aanvulling op dit advies stelt de CCD twee algemene voorwaarden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van 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 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. 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.

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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


H. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 mei 2016 tot en met 1 mei 2021, voor het project "Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische index van chemotherapie" met aanvraagnummer AVD103002016499, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Voor de uitvoering van het project is de Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 maart 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 maart 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 31 maart 2016, ontvangen op 31 maart 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Testen van nanomedicijnen in muizen	Muizen (Mus musculus) / Balb/C	496	100,00 % Matig	

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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 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 blijvende 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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 25 mei 2016 10:27
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD103002016499

Geachte RU DEC,

Op 31-03-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Klaring van chemisch reactieve nanomedicijnen ter verhoging van de therapeutische ind' met aanvraagnummer AVD103002016499.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

We danken u voor uw advies en we koppelen graag het besluit van de CCD terug. De CCD heeft besloten de aanvraag toe te wijzen.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl