

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2016795	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	NTS aangepast	x								
4	Project proposal				x		x	x		
5	bijlage animal procedure 1				x		x	x		
6	bijlage animal procedure 2				x		x	x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x			
8	acceptatiebrief				x		x			
9	brief vragen CCD aan vergunninghouder				x		x			
11	DEC advies				x		x			
12	Advies CCD aan bestuur		x							x
13	Beschikking				x		x			

AVD 118002016795

1



22 DEC. 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 11800															
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Academic Medical Center Amsterdam</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>343362777</td><td></td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]		KvK-nummer	343362777							
Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	343362777																
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>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Meibergdreef</td><td>31</td></tr><tr><td>Postbus</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>1105AZ</td><td>Amsterdam</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL68RABO0136166741</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC</td></tr></table>	Straat en huisnummer	Meibergdreef	31	Postbus			Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam	IBAN	NL68RABO0136166741		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC	
Straat en huisnummer	Meibergdreef	31															
Postbus																	
Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam															
IBAN	NL68RABO0136166741																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td colspan="2">Senior Scientist</td></tr><tr><td>Afdeling</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Senior Scientist		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Senior Scientist																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td colspan="2">Scientist</td></tr><tr><td>Afdeling</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Scientist		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Scientist																
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	[Redacted]	<input checked="" type="radio"/> Dhr. <input type="radio"/> Mw.
	Functie	Scientist	
	Afdeling	[Redacted]	
	Telefoonnummer	[Redacted]	
	E-mailadres	[Redacted]	
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input checked="" type="radio"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag		
	<input type="radio"/> Nee		

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	<input type="checkbox"/> 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
	<input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier <input checked="" type="radio"/> Nee > Ga verder met vraag 3
2.3 Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	<input checked="" type="radio"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> 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	1 - 03 - 2017
	Einddatum	1 - 03 - 2022
3.2 Wat is de titel van het project?	Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Testen antistoffen tegen kanker	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC AMC
	Postadres	Meibergdreef 31
	E-mailadres	[Redacted]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- 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.*

5 Checklist bijlagen

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

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.

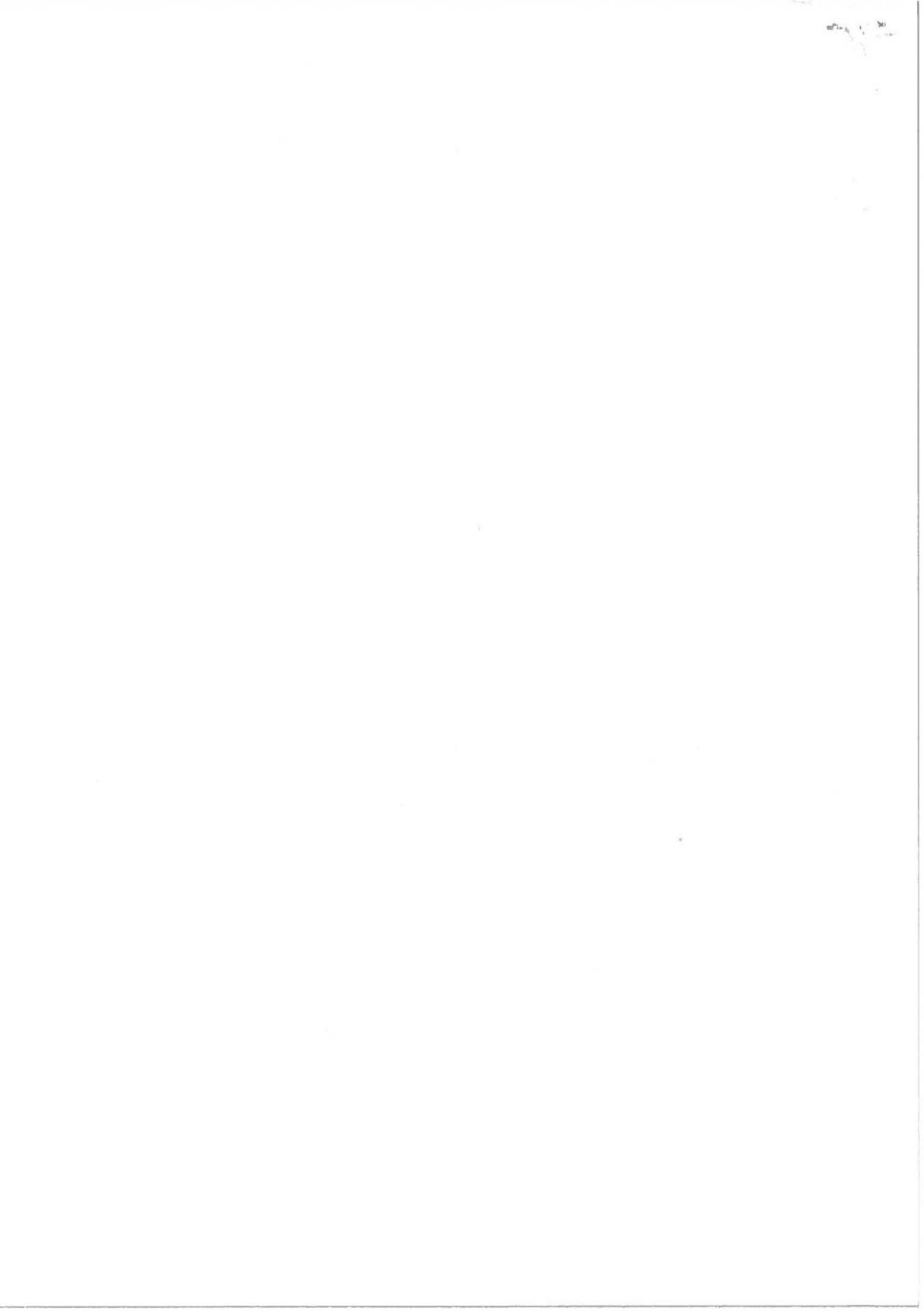
Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Amsterdam

Datum 19-12 - 2016

Handtekening [REDACTED]





Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Background cancer

Every year, more than 30% of the deaths in the Netherlands are caused by cancer (WHO – cancer program). Although major improvements in the therapies for several types of cancer have reduced

lethality (breast cancer, prostate cancer), many cancer types remain resistant to therapy resulting in poor survival rates. Additionally, intense treatment regimens in particular with cytostatic or cytotoxic drugs can result in serious treatment-related complications with lifelong increased morbidity and mortality risk. Novel tumor-specific therapies with less side effects and better therapeutic efficacy than the current treatment modalities are therefore highly desired. Tumor-specific therapeutic antibodies could be such new treatment modality.

Therapeutic antibodies

Over the last 30 years, monoclonal antibodies (mAbs) have emerged as efficacious cancer therapeutics. Most recent antibody based strategies that are clinically successful have been focused on targeting and activating immune cells by blocking inhibitory molecules, so-called check-point inhibitors. Despite clinical success, these antibodies often give rise to severe autoimmunity while large groups of patients remain unresponsive.

There is therefore a growing demand for antibodies that directly target and kill the tumor cells. Testing the efficacy of such mAbs is the main purpose of this application.

Antibody based therapies can invoke tumor cell death by different mechanisms such as blocking cell surface receptors responsible for growth and survival or trigger immune effector mechanisms such as Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC) and Complement Dependent Cytotoxicity (CDC) via their Fc-tail.

Recently, it was shown that the anti-tumor response of tumor-binding antibodies with limited killing effect can be successfully enhanced by linking the antibody to a cytostatic drug, so called antibody-drug-conjugates (ADCs). In addition, bi-specific antibodies have been made with one arm binding to the tumor and the other arm reacting with and activating cytotoxic cells such as Cytotoxic T cells (CTL) or Natural Killer (NK) cells. Such bispecific antibodies kill tumor cells *in vivo*. We will refer to these engineered antibodies as "modified" in the remainder of this document.

As compared to more classical treatment regiments such as irradiation and chemotherapy tumor targeting antibodies typically display relative mild side-effects in cancer patients. Several monoclonal antibodies are currently successfully used in the clinic (for instance Rituximab (anti-CD20) or Trastuzumab (anti-Her2)) and many more are in development (Weiner, 2015)

Development of new therapeutic antibodies

[REDACTED]

We assume that cancer patients who show long term remission or stable disease following chemo or immune targeting therapies ("elite" patients) make antibodies that contribute to prolonged survival. From these patients we isolate and screen the antibody-producing B cells to find antibodies with therapeutic potential against novel targets or epitopes. This original approach allows us to isolate the most effective and safe monoclonal antibody from an elite patient as it has been naturally selected against the tumor of the patient.

Alternatively, we can successfully isolate antibodies from immunized mammals. This approach allows the generation of an antibody against a specific known target. Most of the antibody currently approved for clinical use has been generated by immunizing mammals.

Lead candidate antibodies are selected on the basis of their capacity to bind tumor cells and their ability to block the growth of tumor cells *in vitro*. We are particularly interested in antibodies that exhibit strong potential against more than one tumor type, for instance they react with both [REDACTED] carcinoma.

These antibodies may be applied as therapeutics for treatment of cancer patients either as a "naked" antibody (that is the non-modified form) or as a modified antibody. In addition, they may be useful for diagnosis for cancer. For instance, antibodies that react with tumor cells of subsets of patients suffering a

particular cancer may be used to stratify the patient group and refine the best therapeutic strategy.

In vivo efficacy testing

To address the question whether our mAbs can be further developed as therapeutic we need to assess their efficacy in eliminating tumor cells *in vivo*. As tumor progression is a complex process involving the tumor environment, blood and lymph vessels and tumor cells can spread throughout the body (metastasis), the use of experimental animals is required to reliably assess the action of a mAb on the tumor because we cannot do these experiments in human beings. For both ethical and practical reasons mice are the most accessible experimental animals for this purpose. Although they remain a model and as such have limitations (presence of murine stroma, species-specific cytokines or hormones, absence of a full human immune system, ...), it has been demonstrated that the histo-morphology and gene expression profiles human tumors growing in such mouse models are quite similar to the originating tumor (DeRose et al., 2011; Loukopoulos et al., 2004) .

3.2 Purpose

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

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

The main objective of this project is to identify antibodies that impair tumor growth and/or spreading *in vivo*, or eliminate the tumor cells all together. To achieve this objective, we will test whether mAbs that have been isolated from cured cancer patients or immunized animals affect the growth of one or more tumor types in an *in vivo* mouse model. The results of those experiments will inform us whether further pre-clinical development of the mAbs is warranted. Once proven functional in a mouse model our antibodies may be tested for toxicity in for instance Cynomolgus monkeys (crab-eating macaques), experiments that are necessary for filing the antibody as an Investigational New Drug (IND) to the EMA (European Medicines Agency) or FDA (Food and Drug Administration). Approval of such organizations is required for initial testing of new therapeutics in patients. Should the antibody not be efficacious in the mouse models, this very costly and time-consuming follow up will not be done.

The antibodies that will be evaluated in this project are selected after extensive stringent *in vitro* characterizations. Only a limited number of mAbs will qualify to be tested *in vivo* in this project based on their reactivity, stability and specificity to tumor cells vs healthy tissue. We anticipate that we will test up to 5 mAbs per year.

Several cancer types and antibodies or combinations of antibodies will be tested for anti-tumor reactivity. To assess this main objective, 2 steps will be required in this project:

- 1. Development of tumor xenograft mouse models.** First for each different tumor we will conduct a pilot experiment to establish a model to grow that particular tumor in mice. Sources of tumor cells may be *in vitro* grown cell lines, patient derived tissues or organoids derived from tumor cells. Some tumors rely on human stroma for their growth. In those cases, we will also provide human stromal cells (such as mesenchymal stem cells) to support tumor growth. The development of similar models has most likely been performed by other labs. However, the models need to be established and refined in our hands before testing the antibody. This will be performed after systematic review of the works of other labs.
- 2. Antibody efficacy testing.** Antibodies with therapeutic potential will be tested for efficacy in mice grafted with tumors (as established under step 1). We will assess that the injection of this mAb stops or at least delays tumor growth and metastasis. We will first test 'naked' antibodies. If these 'naked' antibodies are highly specific for binding to tumor cells (thus show no/minimal binding to healthy tissues), but do not affect the tumor we may modify the antibody to an antibody-drug conjugate (ADC). In an ADC format the antibody is directly coupled to a highly cytotoxic drug. Alternatively, in a bi-specific format the anti-tumor antibody is coupled to a second antibody that binds cytotoxic T cells or cytotoxic NK cells. Bi-specific antibodies served to bring tumor cells and

the cytotoxic lymphoid cells in close proximity after which the cytotoxic cells will recognize and kill the tumor.

Before the modified antibodies can be used in *in vivo* experiments we will extensively characterize their activities in *in vitro* experiments. If these experiments are not positive, thus the tumor cells are not killed *in vitro*, the antibody formats will not be used in the *in vivo* experiments.

The objectives are achievable since there is a large body of literature that describe tumor models similar to those we want to establish here. Moreover, we have extensive experience with grafting human tissues (both tumor and healthy) in mice.

Antibodies against several tumor types are developed by different teams in our lab. In order to ensure that a tumor model is developed only once and handled consistently, a dedicated team of skilled persons experienced in animal experience has been set up to test all those antibodies. This allows us to efficiently combine experiments when possible (reducing number of control mice needed) and ensure that the best techniques are applied through our continuous training and exchange with *in vivo* models specialists.

Overview of the number of mice involved:

Appendix	Aim	Number of mice / year	Total number of mice
1	Establishing 5 tumor models / year	100	500
2	Efficacy of mAb alone	420	2 100
	Efficacy of mAb in combination	600	3 000
total			5 600 mice

3.3 Relevance

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

We aim to develop therapeutic antibodies for cancer types with high unmet medical need, both hematopoietic malignancies and solid tumors.

Hematopoietic malignancies

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a disease with a high unmet medical need that is prevalent mostly in elderly. Multiple Myeloma (MM) is even more devastating and except for an experimental drug no cure exists for this disease.

A method of choice for treatment of AML and MM is hematopoietic stem cell transplantation. However, a suitable donor is often not available and this approach typically results in severe graft versus host responses. Moreover, with MM, the probability of relapse (return of the tumor) is very high.

Solid tumors

In recent clinical trials antibodies that boost the patient immune response (so called checkpoint inhibitor antibodies) have proven themselves as valuable therapeutics for solid tumors such as melanoma and colon carcinoma. These strategies are prone to induce severe autoimmunity. Moreover, in melanoma only 40% of the patient population shows a response to these drugs with an extend lifespan of 2-3 year at most for metastatic disease. Pancreas cancer is inoperable and incurable. An extremely harsh chemotherapy regimen can be given, but is still very inefficient. Typically, when patients with pancreas carcinoma of the duct are diagnosed the disease has metastasized. At this stage of disease, the 5-year survival is around 1%. Similarly, metastasized prostate cancer, breast cancer, ovarium cancer, renal cell carcinoma, colon carcinoma and non-small-cell lung cancer also presents a high medical need with in Europe a 5-year survival rate of less than 30%, 22%, 17%, 10%, 5%, 1% respectively.

Clinical relevance

Thus there is an urgent need for new treatment options for patients suffering from these cancers. We isolate antibodies with therapeutic potential from rare elite patients that display an exceptionally positive clinical outcome. Since the antibodies generated have already proven themselves in a patient they may allow for a much more efficacious treatment as compared to the current standards of care. We also anticipate that antibody treatment will result in less treatment-related complications than current therapies for AML, MM, melanoma, and colon carcinoma and for much needed novel treatment options for pancreatic cancer.

Currently the aim is to develop antibodies targeting the cancer types described above, later other cancers will follow. In this proposal we will test the efficacy of novel antibodies reactive to cancer cells in human tumor xenograft mouse models.

3.4 Research strategy

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

The goal of the project is to isolate tumor-reactive antibodies from cancer patients or immunized animals that show prolonged survival or at least display signs of tumor regression. The goal is to develop these antibodies for treatment of the next generation cancer patients.

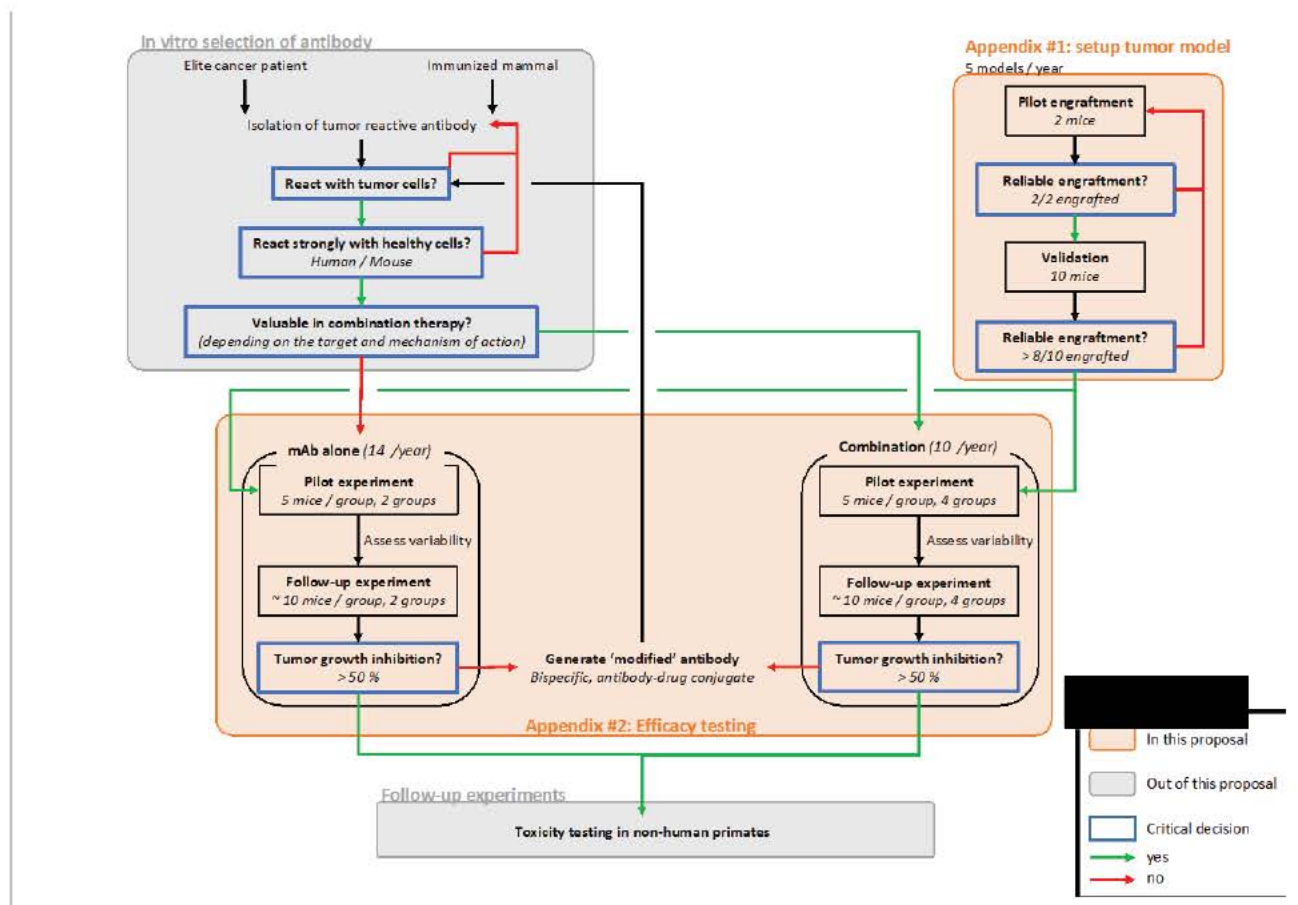
In the lab candidate antibodies are tested for their anti-tumor reactivity and selected for minimal reactivity to healthy cells. Antibodies that meet these criteria need to be tested for inhibition of tumor growth and/or metastasis in an *in vivo* setting.

Before starting an *in vivo* experiment, the reactivity of our antibodies against several tumor types will be evaluated *in vitro*. Antibodies reactive against more than one tumor type is especially interesting as new drug candidates. Based on this evaluation, the *in vivo* experiments may not be restricted to the original tumor only. If the antibody reacts to multiple tumor types *in vitro*, the tumor type of the original elite patients will be tested first and the others candidate tumors might be tested as well.

The *in vivo* testing consists of 2 parts.

1. Develop human tumor xenograft mouse models for both hematopoietic and solid cancers including but not limited to AML, Multiple Myeloma, melanoma, colon carcinoma, pancreas carcinoma, prostate cancer, renal cell carcinoma, breast cancer, ovarium cancer, non-small-cell lung carcinoma (**Appendix#1**);
2. Determine the ability of the antibodies to control tumor growth and metastasis in tumor xenografted mice (**Appendix#2**).

A schematic overview of the project and the successive decision points (go / no go) is depicted in the figure below.



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.

Part 1. Tumor xenograft development *in vivo*.

In this part, immunocompromised mice or mice carrying a human immune system will be transplanted with tumor tissue derived from patients, tumor cell lines, or organoids thereof. The use of immunocompromised mice is required to allow efficient engraftment of human cells without being rejected by the host immune system. The presence of human immune cells might be required for the full efficacy of some of our antibodies. For instance, in the past we have isolated antibodies which kill tumor cells via Antibody Dependent Cell Cytotoxicity (ADCC). This mechanism of killing requires the presence of NK cells to eliminate the tumor.

Animal models for the tumors described here are described by other labs. A careful review of the literature will help us refine our procedures.

For adult mice, the cells will be injected intravenously, intraperitoneally, subcutaneously or orthotopically. In newborn mice, cells may be injected intrahepatically. This route allows efficient engraftment of human hematopoietic cells (either to establish a human immune system or to engraft hematological malignancies). Tumor pieces will be transplanted subcutaneously or orthotopically. Some tumors require additional cells or structure to faithfully engraft (e.g. bone stromal cells). In this case, those cells will be implanted in advance in the mice or co-transplanted with the tumor. In case the tumors are grafted under the skin, tumor growth will be monitored by caliper measurement. When possible the tumor cells grafted in the mice are modified to express reporter genes (e.g. luciferase or GFP) allowing us to determine growth and tumor cell spreading by bioluminescence/fluorescence camera. In addition, for testing the effect of antibodies on blood tumors (leukemia's) we may regularly sample blood and measure the number of GFP positive tumor cells in the blood or measure tumor-released molecules in the blood stream. When the transplant reaches a maximum tumor size (usually 2 cm³), mice will be sacrificed and the tissue will be collected and analyzed.

Patient derived tumor material is typically limited and not enough for a complete experiment. To increase

the obtained tumor tissue, we will first expand it in a small number of mice. From these mice the tumor tissue will be harvested and secondary transplanted to a larger cohort of mice. This should produce enough mice all carrying the exact same tumor allowing appropriate statistical analysis to observe an antibody mediated tumor effect.

Part 2. Efficacy of candidate mAbs.

Antibodies that in *in vitro* assays show reactivity to tumor cells, while minimally affecting healthy cells, are selected for further characterization in an *in vivo* setting.

To generate information on the exact mechanism(s) by which the different antibodies exert their anti-tumor mechanism and to determine the most optimal setting for tumor eradication different experimental settings might be applied;

Direct inhibition of growing tumors

To determine whether an antibody is able to slow down the growth of a tumor, we will first establish a growing tumor in mice. After intravenous injection of antibody, changes in tumor size are measured in time.

In this setting when using a highly aggressive tumor we may observe metastasis from the subcutaneous tumor to internal organs. Antibody mediated inhibition of metastasis will be observed by bioluminescence imaging. If the tumor cells cannot be modified to express luciferase, other approaches such as qPCR quantification of human cells in a mouse organs or histology will be used.

Inhibition of metastasis (detachment of a tumor cells from the original tumor, migration and seeding in a new location)

For tumors that do not easily metastasize from the subcutaneous site we will inject tumor cells directly in the blood stream. After this metastatic lesions will most likely form in lungs and liver. By luciferase imaging antibody mediated inhibition of metastasis can be monitored by bioluminescence imaging.

Inhibition of tumor seeding (adherence of tumor cells in a new environment)

For antibodies that are predicted to impair the seeding of tumor cells and thus outgrowth of new tumor masses the antibody will be injected before or simultaneously with the graft of tumor cells. Tumor growth is monitored both by caliper measurement and bioluminescence imaging.

Comparison to and combination with existing therapies

To get an idea how our new antibodies compare to known therapies for cancer treatment mice will be treated with drugs or treatment regimens currently used as the standard of care.

In addition, we may use our antibodies in combination with other therapeutic agents (e.g. small molecule inhibitor or checkpoint inhibitor antibodies (e.g. anti CTLA4 or anti PD1/PDL1) to determine if these drugs have a synergistic effect on tumor growth.

Antibodies requiring effector cells or complement

For antibodies that in *in vitro* assays have shown to require effector cells such as Natural Killer (NK) cells, macrophages, or neutrophils to exert their anti-tumor effect via Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) we may co-inject human hematopoietic cells (e.g. total peripheral blood mononuclear cell or enriched NK cells) or use mice carrying a human immune system (HIS mice).

Similarly, for antibodies that require complement to exert their anti-tumor response via Complement Dependent Cytotoxicity (CDC) we will co-inject complement in complement-deficient mice strains.

Alternative antibody formats

To enhance its effect, we may couple the antibody to a cytotoxic drug generating so called Antibody Drug Conjugates (ADCs). Alternatively, to attract cytotoxic T cells to the tumor site the lab developed a technique to make bi-specific antibodies linking an anti-tumor and an anti-CD3 antibody together

Lastly, for antibodies where effector functions such as ADCC and CDC are undesirable Fab-fragments (antibodies lacking the Fc-tail required for effector functions) will be generated.

All these different antibody formats have been shown to be clinically effective.

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.

Both parts of this proposal as well as the *in vitro* work preceding the experiments described in this proposal are interconnected (see also accompanying decision tree);

Background

██████████ has the ability to develop antibodies directly from patients with a good clinical outcome. The assumption is that these antibodies have already been proven themselves to contribute to the control or eradication of tumor cells. Moreover, since these antibodies are derived from human individuals they are expected to be safe for clinical use. Nevertheless, both safety and efficacy need to be tested in the pre-clinical trajectory.

In vitro selection of antibodies

In our laboratories the patient derived antibodies are tested for reactivity to both tumor cells and healthy cells. If we have indications that the antibodies have an unacceptable strong reactivity against healthy cells further development is not warranted.

Simultaneously the antibodies are subjected to a series of assays to elucidate the mechanism by which tumor growth or spreading is inhibited. Unfortunately, *in vitro* assays only partially mimic the processes that are involved in disease progression. Mouse models provide an amenable and efficient way of determining tumor growth under conditions resembling a human setting.

In vivo antibody efficacy assay

Establishment of the different xenograft tumor models is required to test the effects of antibodies (**Appendix#1**). We will setup a number of different models depending on the tumor type and research question that needs to be answered.

In **Appendix#2** we describe the actual experiments to determine the inhibition of tumor growth and spreading by the antibodies under investigations.

Follow up to this proposal

Antibodies that have been proven effective, thus reducing tumor growth or eliminate the tumor, may be chosen to continue the preclinical stage of drug development. Most likely this will include GMP complying production of the antibodies and subsequent toxicity testing in non-human primates (note: this type of toxicity test is not part of this DEC application). Such studies are required by the EMA or FDA before they give approval to test the antibodies in patients.

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	Setup tumor xenograft models
2	Antibody efficacy testing
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

References

DeRose, Y.S., Wang, G., Lin, Y.-C.C., Bernard, P.S., Buys, S.S., Ebbert, M.T., Factor, R., Matsen, C., Milash, B.A., Nelson, E., et al. (2011). Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat. Med.* 17, 1514–1520.

Loukopoulos, P., Kanetaka, K., Takamura, M., Shibata, T., Sakamoto, M., and Hirohashi, S. (2004). Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas* 29, 193–203.

[REDACTED]

Weiner, G.J. (2015). Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 15, 361–370.



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'.	11800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	AMC	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 1	Type of animal procedure Xenograft

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The general goal of the project is to develop new monoclonal antibodies for cancer treatment. For this purpose, we want to test antibodies with therapeutic potential or modified version thereof (antibody drug conjugates, bi-specific antibodies or other derivatives) on tumor development *in vivo*. To be able to test the effect of the antibodies on tumor cells *in vivo*, reliable models of tumor engraftment and well-characterized growth are needed. To this aim, human tumor cells or tissue are grafted in mice after which tumor growth and spreading is followed in time. We already know that the antibodies currently under development are reactive to multiple types of cancer. To test the antibodies against different types of cancer, we need to develop a broad selection of human tumor xenograft models. The following table gives examples of the different cancers that we will explore. Additional tumor types might be added if we find a promising antibody candidate reactive against another type of cancer. The development of the different tumor mouse models is described here in **Appendix#1**.

Hematopoietic cancers

[Redacted]	[Redacted]
------------	------------

Solid cancers

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

We plan to develop and validate *in vivo* models of tumor growth for the purpose of testing the anti-tumor reactivity of new antibodies with therapeutic potential. For every tumor and tissue type a careful review of the literature will help us select the best conditions to reliably engraft and grow it *in vivo*. For all the models developed in this **Appendix#1**, the primary outcomes will be the reproducible engraftment and growth of the tumor tissue as measured by the presence of engrafted cells or tissues in the animal. Additionally, at the end of the procedure tumor tissue and mouse organs will be collected for analysis by a renowned pathologist. Also we may determine the gene expression profile and confirm the expression of the antibody target antigen. Once we have established, refined and validated protocols allowing reliable tumor engraftment and development in mice they will be used to test the efficacy and our antibodies as described in **Appendix#2**.

Our lab has extensive experience with the engraftment of () cells in immunocompromised mice under previously approved protocols. In these cases, where procedures for tumor engraftment are running satisfactory most procedures described in this **Appendix#1** can be largely omitted and we will proceed with testing the efficacy of tumor-specific antibodies.

In order to be effective, some antibodies need human effector cells such as T cells and NK cells. Whether this is the case with particular antibodies that we wish to test in the mouse models, will first be determined by *in vitro* experiments. If these experiments show that the antibody under investigation indeed requires human effector cells for an effective anti-tumor response peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or individual hematopoietic subsets (for example T cells, NK cells, myeloid cells) will be co-injected in the relevant mouse model simultaneously with the antibody. Alternatively, to provide the antibody with a source of human effector cells the experiments may be performed in mice carrying a human immune system, so called HIS mice. Hereto immunocompromised mice are, several weeks prior to the tumor xenograft experiment, engrafted with human hematopoietic stem cells (HSCs). Mice successfully grafted with HSCs develop a human immune system that can aid anti-cancer antibodies to stop or slow down disease progression.

The procedures described below will be carried out for each tumor cells type. This will allow us to refine and optimize the models in the experiments described in **Appendix#2**.

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

I- General overview of the process.

The following steps are an indication of the procedures that could be performed in order to obtain a reliable tumor model. For every tumor type, only a selection of those procedures will be applied based on the literature, our knowledge and the mechanism of action of our antibody.

For instance, the engraftment of followed the following path:

- We started by engrafting immune-deficient animals with cell lines subcutaneously. This proved a reliable engraftment technique and this model was used to study the effect of antibody on an established tumor.
- As one of our antibody's mechanism involved the presence of human effector cells, we refined our model by working with immune-compromised mice harboring human immune cells. Immunocompromised mice were sublethally irradiated before injection of human hematopoietic stem cells. After validation of the presence of human cells in the peripheral blood of the animals, cell lines were injected subcutaneously as before. Both the human engraftment and the tumor growth in this second model were reliable and allowed the use of this

model to test the efficacy of our antibody.

II- Pre-conditioning of the mice (Optional).

From literature, it is known that human tumor cells can grow out in immune-deficient mice. However, engraftment of tissues is not always successful and can in particular be difficult for patient derived tumor samples. To facilitate the engraftment of tissues we may pre-condition the mice to further dampen their immune response. The following approaches can be used:

- Sublethal irradiation. The dose of irradiation may vary according to the mouse strain and the age of the animals: typically, new-born mice receive a 3.5Gy irradiation dose, with the notable exception of the animals bearing the scid-mutation (such as NSG mice) that only tolerate a dose of 1.0Gy due to their relative high radio-sensitivity. Adult mice receive higher irradiation dose (respectively 4.5Gy and 2.0Gy). Alternatively, a double dose at two time points can be given: 2x 1-4.5Gy in 2 sessions at least 2 hours apart.
- Sublethal chemotherapy (e.g. busulfan) treatment. Both strategies will result in depletion of the mouse hematopoietic stem cells, resulting in a reduced number of mouse immune cells. 25 mg/kg will be injected IP (20 μ l/g bodyweight) in adult mice. If needed, because one injection is not sufficient to achieve the desired pre-conditioning a second injection can be given after 12-24h.
- We may also have to deplete certain mouse cell types that affect the growth of the tumor (for instance macrophages or monocytes). This may be done by using depleting antibodies. Depending on the half-life of the antibody used, the injection may be repeated several time throughout the duration of the experiment.

From our experience, we anticipate that 30% of the tumor types we will work with require pre-conditioning.

III- Engraftment of tumor tissue

Tumor can be grafted in mice in different forms:

a. Engraftment of Tumor cells.

Single cell suspension of tumors cells will be obtained from either cultured tumor cell-lines or patient derived material. The obtained cells can be genetically engineered to express reporter markers (such as luciferase or a fluorescent protein) in order to quantify their proliferation *in vivo*.

The single-cell suspension will be injected via different routes according to Diehl *et al.*, J. of Applied Toxicology, 2001:

- Intravenously (maximum volume: 125 μ l),
- Subcutaneously in 2 flanks (maximum volume per injection site: 10 μ l/g). In this case cells can be injected alone or combined with Matrigel. The number of cells that needs to be injected to obtain a reliable engraftment is dependent of the tumor cells and will be evaluated for every model based on the literature available.
- Subcutaneously in a scaffold, a three-dimensional microenvironment that provides a niche for the tumor cells. Some tumors require specific environment that can be provided by engrafting 2-3 mm calcium phosphate scaffolds under the skin via surgery (Groen Blood 2012). Adequate pain relief will be applied before surgery and it will be performed under anesthesia on a thermally-controlled surgical pad. The incision will be closed with two a-traumatic stiches. Tumor cells are either preloaded in the scaffold before its implantation or loaded in the implanted scaffold by an injection through the skin. Alternatively, a supporting structure can be developed by the subcutaneous injection of human stromal cells and Matrigel (10 μ l/g). The injection of these cells will results in the formation *in situ* of a structure susceptible to support tumor growth in a physiological environment.
- Intrahepatically in newborn mice (30 μ l max). At birth the mouse liver is a major

hematopoietic organ that support the engraftment of human hematopoietic cells (Traggiati et al., 2004) . In particular, for AML this has been shown to generate a reliable model (Ellegast et al., 2016) .

- In order to reliably engraft, it is known for some tumors or tissues that support cells (e.g. stromal cells, hematopoietic cells) are required *in vivo*. If needed, those cells can be co-transplanted with the tumor cells (see below) or implanted in advance. Those human cells can be injected in the liver of newborns (up to 5 days) (30 μ l max) or in adult SC 10 μ l/g; IP 20 μ l/g or IV 5 μ l/g.

b. Subcutaneous engraftment of tumor or organoid tissue.

If available, pieces of tumor tissue, surgically resected from patients, may be transplanted to create so-called Patient Derived Xenografts (PDX) in the mice. These mice are called PDX mice. The original material that comes from the operation room will be cut into small tumor pieces and placed subcutaneously in both flanks. Adequate pain relief will be applied before surgery and it will be performed under anesthesia on a thermally-controlled surgical pad.

c. Orthotopic transplant of tumor or organoid cells

To further improve our tumor xenograft models tumors may be grown in their respective environment (for example [REDACTED]). In this case, tumors cells or human organoid tissue will be injected *in situ* using surgery. The volume of injection is depending of the organs and will be establish for every procedure based on the literature with a maximum of 100 μ l. Adequate pain relief will be applied before surgery and it will be performed under anesthesia on a temperature controlled surgical pad. An incision in the abdominal wall will be performed and the cells injected in the target organs. The abdominal wall will be sutured with absorbable suture. The skin incision will be closed with two a-traumatic stitches.

To expand tumor cells or produce a cohort of mice carrying the exact same tumor the tumor may be harvested from the original mice and secondary transplanted to new mice. This expansion of the tumor for subsequent experiment can be done with procedures described in 2a, b and c.

IV- Co-injection of effector cells

Some antibodies require the presence of effector cells to exert their anti-tumor effect. Their efficacy will therefore be assessed in Appendix #2 in presence of said effector cells. Since these effector cells (e.g. total Peripheral Blood Mononuclear Cells, T cells or NK cells) may also affect the growth of the grafted tumors, we will characterize in this appendix their effect on the growth of the tumor. The number of effector cells given may differ for each tumor type.

In addition, we may regulate the activity of the effector cells by giving the mice stimulating or inhibitory cytokines or other factors. One example is a complex of IL-15 and IL15R α , which has been shown to induce NK cell proliferation and differentiation (Huntington et al., 2009) .

The cells will be injected either IV 5 μ l/g; IP 20 μ l/g; SC 10 μ l/g directly in the tumor. The inhibitory or stimulatory factors will be injected either IV 5 μ l/g or IP 20 μ l/g.

V- Monitoring tumor or tissue growth

Caliper measurement

After tumor cell graft or tissue implantation, animals will be monitored for tumor formation and growth. If the tumor has been implanted under the skin, a caliper will be used to measure tumor size twice a week.

Bioluminescence imaging

Genetically modifying the tumor cells to express markers such as luciferase and GFP allows in vivo imaging of the tumor size using a bioluminescence imager. Injection of

Luciferin will be performed IP (20 μ l/g) at least 10 minutes before imaging. To enhance the sensitivity of imaging the mice are either shaved using an electric razor or treated with a hair removal product such as Veet. To obtain exploitable pictures, the imaging procedure will be performed under anesthesia. As the acquisition can take several minutes, mice will be kept warm during the procedure.

Plasma markers

Alternatively, tumor specific markers, number of circulating tumor cells (CTCs) or tumor derived extracellular vesicles may be quantified in the plasma of the mice. Bleeding every 1 to 2 weeks (with a maximum volume of 10% (8 ml/kg) of the circulating blood if the mice are bled once every 14 days or 7% (6.4 ml/kg) if the mice are bled weekly).

VI- Surgical resection of subcutaneous tumors

Metastasis is the cause of 80-90% of human cancer deaths (Weigelt et al., 2005). Long-term follow-up of the mice to study the occurrence of metastasis is thus essential. The tumor that grows at the site of inoculation is the primary tumor; all tumors that grow at distant sites (as a result of metastasis) are secondary tumors. To allow longer follow up of growing secondary tumors the subcutaneous growing primary tumor can be surgically removed. When the primary tumor reaches a size of approximately 1 cm³ a skin incision is made at the tumor site, the tumor is removed and the skin is closed using stitches or biological glue (Doornebal et al., 2013; Sukin et al., 2001). Adequate pain relief will be applied before surgery and the surgery will be performed under anesthesia on a temperature controlled surgical pad. The treated mice will be monitored for a maximum of 8 weeks to assess the growth of secondary tumors. This technique will be mostly applied when working with tumor cells modified to express luciferase to allow easier tracking of metastasis development. If signs of discomfort (i.e. shortness of breath in case of lung tumors) mice will be sacrificed earlier.

VII- Sacrifice

The total duration of the experiments will vary depending on the aggressiveness of the tumor but mice will always be sacrificed before the age of 8 months.

Animals will be euthanized before the planned end of the experiment when the size of one of the subcutaneous grafts reaches 2 cm³, when one of the grafts becomes ulcerative or when another humane endpoint is reached. Tumors will be isolated for histological and molecular characterization.

Mice will be sacrificed by lethal bleeding under deep-anesthesia followed by cervical dislocation.

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

Under this **Appendix#1** we are developing new xenograft mouse models.

We will proceed in a stepwise manner: Two animals will be engrafted with tumor tissue at a time and based on the tumor or tissue outgrowth the protocol will be adjusted in a subsequent step in which again 2 animals will be engrafted until reliable engraftment is achieved (both mice engrafted). We anticipate that it will take less than 5 rounds and thus 10 animals to achieve this goal.

An additional 10 mice will be used in one experiment to confirm and further evaluate the variability of the model. The data obtained here will be used to adjust the number of mice required in the subsequent procedures. Only models where >80% of the mice show tumor engraftment will be used in future experiments.

This procedure needs to be repeated for every combination of a particular cell or tissue type and mouse strain that will be required for antibody testing. We are planning to develop about 5 models per year.

This makes a total of maximum 20 mice x 5 models x 5 year = **500** mice.
 The models that we develop under **Appendix#1** will be used for experiments described in **Appendix#2**.

B. The animals

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

Immunodeficient mice

In order to allow the engraftment of tumor or human cells or tissue, mice with an impaired immune system (immunodeficient) are required. Many examples of such xenograft models are available in the literature. Mice younger than 8 months will be used.

Genetically modified mice

Certain tumors need specific human growth signals that cannot be provided by the mouse due to lack of cross-species reactivity. In this case, immune-compromised mice transgenic or knock out for specific proteins such as cytokines or MHC molecules will be used. Mice younger than 8 months will be used.

Human Immune System (HIS mice)

To provide the antibodies with hematopoietic effector cells experiments may be performed on a human immune system (HIS) mouse background. [REDACTED] has a long-standing experience in generating HIS mice [REDACTED]. In addition, the Academic Medical Center supports an in house facility from which these mice can be obtained. Alternatively, several companies (The Jackson Laboratory, Taconic, and Axenis) provide HIS mice. HIS mice are made by injecting human hematopoietic stem cells in mice younger than 6 weeks. Human Immune System (HIS) mice will be transplanted with tumor tissue or cells after a mature human immune system has developed. This means that at the time of tumor transplant, the mice will be between 12 and 18 weeks.

The table below represents a list of mouse models that may be used in this project. It is likely that this list will grow depending on the availability of new models that provide more favorable conditions for tumor xenograft experiments.

Immunodeficient mouse strains

NSG (NOD SCID IL2R γ -/-)	NOD-SCID
BRG (Balb/c Rag1/2-/- IL2R γ -/-)	Nude
SCID	

Transgenic mouse strains

BRG HLA-A2 HLA-DR2	MISTRG (hu M-CSF IL-3 huGM-CSF huSIRP α tg huTPO Rag2-/- IL2R γ -/-)
Bcl2 transgenic mice	Flt3 transgenic mice
Mice transgenic for human cytokine genes that promote development of tumors or the immune cells including, but not limited to IL-6 IL-15 G-CSF GM-CSF IL-3	NSG-w41(Kit)

Origin of the mice

The strain will be carefully selected for each combination of tumor type and therapeutic antibody. Many of those strains are available in our facility and will be bred in house. If a strain is not available in our facility, we will obtain it through an approved supplier or from a collaborator.

Sex of mice

For some tumor types, it is known that in vivo engraftment is more efficient in either one of the sexes. If this is the case, either males or female mice will be used. If tumor engraftment is equally efficient, both sexes could be used. However, we experienced more fighting incidences when commercially bred mice are used as compared to in house bred mice. Therefore, when mice are obtained from commercial vendors we propose to use female mice only. There will be a fictional prevention of surplus. To prevent institutional surplus males and because fighting might be less pronounced in institutional bred mice (less stress e.g. transport stress) we will use females and males.

Life stages

Some hematopoietic tumors (e.g. AML primary material) are known to be difficult to engraft in mice. For those tumors, engrafting newborns has been reported to give a better chance of success and will be used in this project. More generally, we will use mice after the age of 6 weeks. Younger mice, due to their small size, represent a challenge to safely and reliably engraft the tumor. When working with HIS mice, tumor cells will be engrafted between 12 and 18 weeks, this is after the human immune system has developed.

If we are not interested in the development of metastasis, mice will be monitored for a maximum of 6 months after tumor implantation. If the tumor reaches a critical size or another human endpoint before 6 months, the mice will be sacrificed early.

When we are interested in the development of metastasis, the primary tumor may be removed when it reaches a size of 1 cm³. The time required to reach this size will vary greatly depending on the tumor used, it can be as short as 1 week and as long as 3-4 months. Once the primary tumor has been resected, the mice will be followed for a maximum of 8 weeks.

In all cases, mice older than 8 months will be sacrificed to prevent age-related discomfort.

Number of mice

We estimate that for developing new xenograft models we will engraft the following numbers of mice:

		Mice / exp	Exp in 5 years	Total
Mice bearing tumors engrafted subcutaneously or intravenously	setup	5 x 2	15	150
	validation	10	15	150
Animals engrafted with human immune cells	setup	5 x 2	7	70
	validation	10	7	70
Animals engrafted orthotopically with tumor	setup	5 x 2	3	30
	validation	10	3	30
Total over 5 years				500

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.

It is known for a long time that due to (epi)genetic alteration, *in vitro* growing tumor cells only partially mimic the growth of tumor cells in patients. Moreover, metastasis, the spreading of tumor cells through the body and main cause for human cancer deaths, is a complex process that cannot be captured in an *in vitro* assay.

Thus in order to determine the efficacies of the antibodies against the tumor and to test the effect of antibodies on metastasis it is necessary to test the antibodies under more physiological conditions. For that purpose, xenografted immunocompromised mice are widely used by researchers in the field.

By a step wise improvement of tumor grafting we only need a limited number of mice to optimize a particular xenograft models. This is also possible because statistical analysis is not needed when establishing a tumor model. Statistical analysis is relevant only when we test the antibodies. Before establishing a model, we will carefully review the literature and establish collaborations with groups with long-standing experience in the generation of specific xenograft models that are not available in our lab. This will also allow us to avoid unnecessary experiments (“we do not intend to reinvent the wheel”) and to refine our procedures by using their experience. Our long-standing expertise in handling immune-compromised mice and developing new models for tumors ensure that we will optimally use the mice and restrict the number of mice to the minimum. Immuno-compromised mice are socially housed in individually ventilated cages with sterile food and water ad libitum and they are handled in a sterile biohazard laminar flow cabinet in order to prevent them from becoming infected by opportunistic pathogens. The mice will receive cage enrichment to reduce stress levels.

██████████ has organized a dedicated team of persons trained to perform all the in vivo experiments of ██████████. This team will ensure that the proper models, strategies and procedure are used making the results more reliable.

Note regarding the use of females only when mice need to be obtained from a commercial party: If no difference in the growth of tumor is expected from the literature between males and females, we will use females for the following reasons:

Aggression is the most common reason for long term individual housing of male mice in research. Ignoring this aggression in commercially purchased male mice is not a choice. Fighting of male mice does have severe effects and cannot be underestimated. Untimely separation of fighting males has resulted in severe wounds on the skin, testis and penis (we have even often seen completely bitten off penis). The animal welfare body estimated this as severe discomfort and this can be avoided by using female mice when scientifically possible.

Long-term solitary housing of mice causes a broad spectrum of behavioral, neurological, molecular, hormonal and physiological changes (isolation syndrome). Moreover, individual housing is a confounder for the experimental results. Individual housing will result a larger standard deviation in the experimental outcome, thus more animals have to be used to determine statistical relevant effects.

All animals have to **be housed individually as in one cage the male mice** start fighting to prevent the confounder effect of the isolation syndrome on the results

Isolation Syndrome is a symptom of psychosocial stress; the use of male mice means increased discomfort for the male mice in this project

The discomfort parameter: social behavior cannot be used anymore

Explain what measures will be taken to minimize 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse

effects on the environment.

1. Generally, engraftment of mice with tumor cells will result in the development of a tumor mass that will result in discomfort for the mouse. We will work only with mice carrying tumors under the reasonable endpoint set by the code of practice for oncology (2 cm³). The discomfort will be minimized by the use of appropriate analgesia and anesthesia before surgery. The experiments will be swiftly performed by skilled personnel. In order to prevent opportunistic infections, immunocompromised mice are handled in a sterile fashion (IVC, sterile food and water, handling in biohazard laminar flow cabinets). Cages are enriched with nesting and hiding material to minimize fear and stress for the mice. Some technical procedures may induce discomfort. The table below provides an overview of expected discomfort and the measures that will be taken to minimize them.

Technique	Potential side effect	Measures to be taken
Irradiation	Direct burn; long-term cardiac effect; growth delay	Use of non-lethal dose. The doses used have been extensively validated in our lab as safe and results only in growth delay
Chemotherapy	Acute toxicity	Use of non-lethal dose.
Clodronate treatment	Blindness if injected in newborns	Clodronate will be used only in adult mice.
Subcutaneous tumor engraftment	Development of tumor mass	Work with mice with tumors before HEP
Intravenous tumor engraftment	Metastasis development in the lung inducing shortness of breath and general pain.	Animal receiving IV tumor injection will be monitored closely and will be sacrificed at the first sign of discomfort. From our expertise using ██████████ we do not observe discomfort in the time frame used in our experiments.
Surgery (scaffold implantation or orthotopic tumor engraftment)	Pain due to the procedure	Surgery will be performed under anesthesia and appropriate analgesia will be used
Injection of effector cells	Graft versus Host if mature human T lymphocytes are injected.	Experiment involving T cells will be carried out in a limited time-frame where Graft vs Host is not expected (usually 2-3 weeks).

2. No adverse effects on the environment are expected in these experiments.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with

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.

Mice will be under anesthesia for
-subcutaneous tumor tissue/organoid transplantation
-subcutaneous scaffold implantation
-intravenous injections (when done in the retro-orbital plexus)
-whole body imaging procedure
-euthanasia

Mice under long anesthesia (e.g. during surgery or whole body imaging) will be maintained on a thermally-controlled surgical pad.

For subcutaneous transplantation of tumor tissue or scaffold the mice will receive postoperative pain relief.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Mice may experience some mild discomfort due to the size of the tumor grafts when engrafted orthotopically or metastasis develop.
- Symptoms of Graft vs Host Disease (GvHD) such as weight loss and overall cachexia (In mice with human immune system only).
- Mice may suffer from shortness of breath
- Opportunistic infections may arise.
- Pre-conditioning of the mice with sublethal irradiation or sublethal chemotherapy may result in moderate discomfort (cachexia) for a short period of time (<5 days).

Explain why these effects may emerge.

- Human immune cells (in case of human healthy cells xenograft or injection of human PBMCs) might recognize and attack mouse cells as foreign cells (Ali et al., 2012) .

- The first site of tumor metastasis is usually the lungs. Tumor formation in the lungs may cause shortness of breath.
- Immune-compromised mice, especially if they are pre-conditioned are at risk of opportunistic infections.

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

Graft versus host

The occurrence of GvHD cannot be properly controlled if human hematopoietic effector cells need to be injected. However, mice will be monitored closely and the experiment will be performed in a short timeframe that should be too short for the development of this adverse effect.

(Zie pag. 9 tabel onderste regel, over duur van experiment).

Additionally, in experiments performed in the past no adverse effects were observed after transplantation of healthy foetal tissues in immune-compromised mice.

Metastasis

Metastasis is one of the most important features of these xenograft models and cannot be controlled. Again, the assays are relatively short and the mice will be taken out of the experiment if the level of discomfort reaches a human endpoint.

Sterile conditions

To prevent opportunistic infection, mice will be housed and handled under sterile conditions.

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.

It can be decided that animals have to be sacrificed before the end of the study when high discomfort due to tumor growth is observed or severe graft versus host disease is observed.

- abnormal and sedentary behavior
- breathing difficulties
- weight loss (>20% compared to highest measured weight, or >15% in short period of time (1-2 days))
- uncoordinated or impaired movements
- subcutaneous lumps other than the implanted cells or tissue
- distended abdomen
- ulceration of the tumor
- the tumor reaching the maximum tumor size of 2 cm³

If a humane endpoint is reached, animal will be sacrificed as described in the experimental procedure. The data collected (e.g. tumor size) will be used to refine future procedures.

Indicate the likely incidence.

-Most tumor bearing mice will eventually develop tumors that exceed the maximum tumor size. When the tumor size reaches the humane endpoint, either the mice are euthanized or tumors are surgically removed for metastasis follow.

-Injection of human PBMCs is known to cause some degree of graft versus host responses. These experiments are short, GvHD is not expected in more than 5% of our (HIS) mice. If it this happens animals will be sacrificed before HEP is reached.

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').

Type of experiment	Freq. of the exp.	Mild	Moderate	Severe
Mice bearing tumors engrafted subcutaneously or intravenously	60 %	60 %	40 % (pre-conditioning, removal of the primary tumor)	
Animals engrafted with human immune cells	28 %		95 %	5% (in case of rapid GvHD)
Animals engrafted orthotopically with tumor	12 %		100 %	
Overall	100 %	36 %	62.6 %	1.4 %

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.

Animals will be killed in order to collect the tumors for subsequent analysis

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

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

Yes

References:

Ali, N., Flutter, B., Sanchez Rodriguez, R., Sharif-Paghaleh, E., Barber, L.D., Lombardi, G., and Nestle, F.O. (2012). Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2R γ null mice display a T-effector memory phenotype. PLoS ONE 7, e44219.

Doornebal, C.W., Klarenbeek, S., Braumuller, T.M., Klijn, C.N., Ciampricotti, M., Hau, C.-S.S., Hollmann, M.W., Jonkers, J., and de Visser, K.E. (2013). A preclinical mouse model of invasive lobular breast cancer metastasis. Cancer Res. 73, 353–363.

Ellegast, J.M., Rauch, P.J., Kovtonyuk, L.V., Müller, R., Wagner, U., Saito, Y., Wildner-Verhey van Wijk, N., Fritz, C., Rafiei, A., Lysenko, V., et al. (2016). INV(16) and NPM1mut AML engraft human cytokine knock-in mice. Blood.

Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., et al. (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and

differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* *206*, 25–34.

Legrand, N., Huntington, N.D., Nagasawa, M., Bakker, A.Q., Schotte, R., Strick-Marchand, H., de Geus, S.J., Pouw, S.M., Böhne, M., Voordouw, A., et al. (2011). Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha)) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 13224–13229.

Sukin, S.W., Chhikara, M., Zhu, X., Ayala, G., Aguilar, L.K., O'Brian Smith, E., Miles, B.J., Thompson, T.C., Kadmon, D., and Aguilar-Cordova, E. (2001). In vivo surgical resection plus adjuvant gene therapy in the treatment of mammary and prostate cancer. *Mol. Ther.* *3*, 500–506.

Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.-C., Lanzavecchia, A., and Manz, M. (2004). Development of a Human Adaptive Immune System in Cord Blood Cell-Transplanted Mice. *Science* *304*, 104–107.

Weigelt, B., Peterse, J.L., and van 't Veer, L.J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 591–602.



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'.	11800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	AMC	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Antibody efficacy testing

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The general goal of the project is to develop new cancer treatments. In this proposal we want to test new antibodies with therapeutic potential for their ability to inhibit tumor growth and spreading in an *in vivo* setting.

For this purpose, we will engraft mice with human tumor under the most optimal conditions as determined under **Appendix#1**. In the experiments described here in **Appendix#2**, we assess the *in vivo* efficacy of our tumor antibodies.

The objective is to show that the antibodies under investigation are able to eliminate the tumor altogether or slow down tumor growth or spreading of the disease. To assess the effect of our antibodies we will consider the following parameters depending whether we study a solid or hematopoietic cancer.

Solid cancers

1. Tumor size of the primary tumor.
2. The number and sizes of metastases.
3. Number of tumor cells circulating in the body.
4. Antibody and cytokine levels in the plasma.
5. FACS profiling and histology on organ and tumors.

Hematopoietic cancers

1. Number of tumor cells circulating in the body.
2. Number and sizes of chloroma (solid tumor composed of immature white blood cells).
3. Antibody and cytokine levels in the plasma.
4. FACS profiling and histology on organs and tumors.

Changes in any of these parameters should indicate that the particular antibody under investigation is able to interfere with establishment and/or progression of the cancer.

When the naked antibody has little to no effect we will test the antibody in different formats

- In combination with a known (FDA approved) therapeutic drug
for example, an anti PD1 checkpoint inhibitor antibody.
- Bispecific antibody
for example, our new antibody coupled to an antibody targeting CD3 to attract T cells.
- Antibody drug conjugate;
our new antibody coupled to a cytotoxic drug

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

Mice will be engrafted with tumor cells as described in **Appendix #1**. Tumor cells may be injected subcutaneous, intravenously or, orthotopic depending on the origin of the tumor cells and on the research question at hand.

Experimental setup

Setup testing new antibody alone

Two groups of mice will receive a tumor graft

Control group receives irrelevant control antibody for example an antibody binding an Influenza antigen

Experimental group receives the experiment anti-cancer antibody.

Setup testing new antibody in combination with a clinically approved drug

Four groups of mice will receive a tumor graft

Control group 1 receives irrelevant control antibody (e.g. anti Influenza antibody) + irrelevant control for the clinically approved drug (e.g. isotype matched control antibody)

Control group 2 receives irrelevant control antibody (e.g. anti Influenza antibody) + clinically approved drug

Experimental group 1 receives the experiment anti-cancer antibody + irrelevant control for the clinically approved drug (e.g. isotype matched control antibody)

Experimental group 2 receives the experiment anti-cancer antibody + clinically approved drug

A pilot experiment will be performed with 5 mice per group in order to assess the gross effect and assist in determining the number of animals required to obtain sufficient power.

Antibody dosing and frequency

The mice will receive antibody by IV 5 μ l/g or IP 20 μ l/g injection. In most situations 3 injections per week will be performed. Some mAbs show rapid clearance of the body and might require daily injection. Start of the antibody treatment differs per experiment. Antibody injections start either before tumor graft, at the day of tumor graft or, after tumors have been established. Mice will be treated for a maximum of 8 weeks.

Alternatively, antibody can be delivered by an osmotic pump surgically implanted subcutaneously on the back of the mice.

Injection of effector cells

As described under **Appendix#1** some antibodies require effector cells to exert an anti-tumor response.

Therefore effector cells such as total PBMCs or enriched NK cells may be co-injected with the antibody (IV 5 μ l/g or IP 20 μ l/g. When possible, one injection comprising mAb and effector cells will be performed).

Monitoring disease progression

During the course of the experiment the mice will be weighed and tumor growth will be determined.

Subcutaneous tumor growth will be measured through the skin using a calliper twice a week (when the tumor is palpable) and/or by *in vivo* imaging by fluorescence or bioluminescence imaging when applicable (up to two times per week).

Non-subcutaneous growing tumors and metastasis will be directly visualised by fluorescence or bioluminescence imaging. Indirectly the number of circulating tumor cells and levels of biomarkers in the blood and by analysis at the end of the treatment. These mice will be subjected to regular bleeding (up to once a week for 8 consecutive weeks, maximum 7% of total circulating blood, 5 ml/kg) to assess the concentration of antibody and the number of circulating tumor cells. These analyses will be continued until the animals are sacrificed.

Experiment duration

Mice will be sacrificed before a humane endpoint is reached. The actual duration of the experiment will depend on the experimental setup and the mechanism of action of the antibody. Tumors in the mice will be allowed to grow for a maximum of 6 months.

As describe in Appendix #1, no mice older than 8 months will be used to prevent age-related discomfort.

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

Every tumor will have a different growth rate and standard deviation. We will therefore base our statistical analysis on the data obtained in a pilot experiment carried out with 5 mice per group.

We will use a power calculator to establish the number of mice required using $\alpha = 0.05$ and $\beta = 0.8$. We aim at finding tumor growth inhibition of more than 50%.

If possible repeated measurements will be used (for instance using luminescence imaging at several time).

For practical and reproducibility purposes, the experiment will be performed in "blocks". Not all the mice required to achieve significant power will be enrolled in one large experiment but rather in several smaller experiments carried out at different time. (for instance if 15 mice / group are required, 3 experiments with 5 mice / group will be carried out. The statistical analysis will take in account the different treatments as well as the different blocks.

B. The animals

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

Details on the strains and their origin used and how tumor bearing mice are generated is described in **Appendix#1**.

To test the anti-tumor response of an experimental antibody versus control, a pilot experiment with 5 mice per group will be performed. This experiment will be followed by a larger experiment to achieve sufficient power (including the data generated in the pilot experiment). From our experience, we have found that a number of mice between 10-15 per group is usually sufficient. Taking in account the 5 mice used in the pilot experiment, we will most likely use less than 10 mice in the follow-up experiment.

We plan to start a maximum of 2 experiments per month. All these estimations are based on the work we have been carrying out in the last year.

We estimate that we will perform 14 experiments testing a new antibody alone (2 groups) and 10 testing it in combination with an approved drug (4 groups).

	Experiment	Mice / exp	Exp / year	Groups	Mice / year
Antibody alone	Pilot	5	14	2	140
	Follow-up	10	14	2	280
Combination	Pilot	5	10	4	200
	Follow-up	10	10	4	400
Total mice/ year					1020

Of note, we have already shown that the antibodies currently in development are reactive against multiple types of cancer. Therefore, one particular antibody will be tested against more than one tumor line (included in this estimation).

For testing antibodies for their anti tumor response we request a maximum of **5 100** mice for 5 years.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

For a long time, it is known that due to (epi)genetic alterations, *in vitro* cultured tumor cells only partially mimic the tumor cells present in patients. Moreover, spreading of tumor cells through the body (metastasis) which is the main cause for human cancer deaths, cannot be replicated faithfully *in vitro*. Tumor cells growing in immunodeficient mice (that do not reject the tumor because they lack a well-functioning immune system) are much more similar to the original tumor cells than *in vitro* cultured tumor cells. Immunodeficient mice grafted with human tumors are therefore widely used in the field to assess the efficacies and safeties of drugs including antibodies *in vivo* and extensively described in medical scientific literature.

Reduction

We identify and isolate tumor specific antibodies from cancer patients or immunised animals who show a durable remission of the tumor in response to a therapy. Only antibodies that bind to tumor only or show a much higher binding to tumor than to non-transformed healthy cells are selected for experiments to test their anti-tumor activity in mice.

As much as possible we will test several antibodies jointly in order to reduce the number of mice used as control.

Refinement

Before injecting the antibody in mice we will determine whether the antibodies that react specifically or preferentially with tumor cells, inhibit *in vitro* their proliferation or migration, or whether they kill the tumor cells either directly or indirectly by inducing Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC),

Complement Dependent Cytotoxicity (CDC). These experiments are being done to understand the mechanisms by which the antibodies might affect tumor establishment and/or progression *in vivo*. The reactivity toward healthy mouse cells will be evaluated in order to prevent mouse-specific toxicity upon injection.

The model used to evaluate the efficacy of our antibody in this procedure will be refined in the **Appendix#1**. If possible, tumor cells will be modified to express a reporter allowing monitoring tumor growth and spreading in time by non-invasive imaging techniques.

AIMM therapeutics has dedicated of team to perform all in vivo experiments for the company. The team members are trained and will ensure that proper models and procedure are used to provide reliable data.

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

1) Engraftment of mice with tumor cells will result in the development of a tumor mass that will be a discomfort for the mouse. To reduce this discomfort, we will work only with mice carrying tumors of a limited size. The discomfort will be minimized by the application of appropriate human endpoints and use of appropriate analgesia and anaesthesia before surgery. The experimental procedures will be performed by technically skilled personnel. In order to prevent infections by opportunistic diseases, immunocompromised mice are handled in a sterile fashion (IVC, sterile food and water, handling in biohazard laminar flow cabinet). Cages are enriched with nesting and hiding material to prevent fear and stress of the mice.

2) Adverse effects on the environment are not expected.

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.

Not applicable.

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

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.

Anaesthesia and analgesia when tumors are surgically implanted in mice as described in Appendix #1.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The adverse effects of growing xenografted tissue are described in **Appendix#1**. Due to their specificity toward tumor cells, additional adverse events of the antibody injections are not expected.

Explain why these effects may emerge.

In **Appendix#1** it is described how the adverse events of xenografted tissue may arise.

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

The tumor load will be determined by calliper and/or luciferase imaging. Animals will be closely monitored for signs of discomfort. When a humane endpoint is reached the animals will be euthanized and subjected to final analysis. However, from experience we know that even tumors reaching the size of the humane endpoint and metastasis are tolerated by the mice with little to no obvious signs of discomfort.

Human immune cells may cause graft versus host responses in mice but these responses are expected to remain mild for the planned duration of the experiment.

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.

- abnormal behaviour
- impaired breathing
- weight loss (>20% compared to highest measured weight or 15% in a short period (1-2 days))
- impaired mobility
- ulceration of the tumor
- tumor size larger than 2cm³

If a humane endpoint is reached, animal will be sacrificed as described in the experimental procedure. The data collected (e.g. tumor size) will be used to refine future procedures.

Indicate the likely incidence.

- Most tumor bearing mice will eventually develop tumors that exceed the maximum tumor size. When the tumor size reaches the humane endpoint, either the mice are euthanized or tumors are surgically removed to analyse formation and progression of metastases. The precise timeline of this experiment will be determined based on the observations obtained from the **Appendix#1**. Therefore, we do not expect to reach a humane endpoint in more than 10% of the mice.
- Injection of human PBMCs is known to cause some degree of graft versus host responses but given the short duration of the experiments severe effects are expected to occur in <5% of animals. In the rare cases that graft versus host response reach a humane endpoint, the mice will be euthanized before the end of the experiment.

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').

All the procedures associated with the monitoring of the tumor and the treatment (intravenous or intraperitoneal injection, weighing, measure tumor size by calliper, intraperitoneally luciferin injection: mild, whole body luciferase imaging procedure) are mild and will not increase the discomfort generated by the implanatation and the growth of the tumor. Estimated discomfort is therefore similar as the one idescribed in Appendix #1:

Type of experiment	Freq. of the exp.	Mild	Moderate	Severe
Mice bearing tumors engrafted subcutaneously or intravenously	60 %	60 %	40 % (pre-conditioning, removal of the primary tumor)	
Animals engrafted with human immune cells	28 %		95 %	5% (in case of rapid GvHD)
Animals engrafted orthotopically with tumor	12 %		100 %	
Overall	100 %	36 %	62.6 %	1.4 %

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.

The mice will be killed at the end of the experiment or when the humane endpoint is reached (maximum 6 months after tumor engraftment). At this point we will collect blood for serum analysis. Than we will examine the inner organs of the mouse to determine the sites of metastasis by luciferase imaging and to subsequently, collect organs for histological analysis.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**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
AVD118002016795
Bijlagen
2

Datum 20 december 2016
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 december 2016. Het gaat om uw project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002016795. 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).

Datum:

20 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD118002016795

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
20 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD118002016795

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 343362777
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: NL68RABO0136166741
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
20 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD118002016795

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 maart 2017
Geplande einddatum: 1 maart 2022
Titel project: Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer
Titel niet-technische samenvatting: Testen antistoffen tegen kanker
Naam DEC: DEC AMC
Postadres DEC: Meibergdreef 31
E-mailadres DEC: dec@amc.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Amsterdam

Datum:

19 december 2016

Datum:

20 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD118002016795



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag


AMC Crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ DUIVENDRECHT


**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
AVD118002016795
Bijlagen
2

Datum 20 december 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 20 december 2016
Vervaldatum: 19 januari 2017
Factuurnummer: 16700795
Ordernummer: 8321 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002016795	€ 1.187,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



8

**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
AVD118002016795

Datum

Betreft Vervolg aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 19 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer" met aanvraagnummer AVD118002016795. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 14 februari 2017 een beslissing. Omdat een DEC-advies is meegestuurd met de aanvraag, streven wij ernaar om de aanvraag binnen 20 werkdagen te beslissen. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**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
AVD118002016795

Datum 17 januari 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 19 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer" met aanvraagnummer AVD118002016795. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

In de NTS schrijft u onder 3.1 het opwekken van antilichamen in konijnen. Wij begrijpen dat dit niet de doelstelling van onderliggend project is, maar voor de leek kan dit verwarrend zijn omdat het kan overkomen alsof in dit project wel konijnen worden ingezet. Graag dit verhelderen in de NTS.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum:

17 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002016795

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting



Melding bijlagen

U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg altijd deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt. Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Academisch Medisch Centrum

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD118002016795

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

17 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002016795

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

A. Algemene gegevens over de procedure

Bij de punten 1 t/m 7 dienen altijd de gevraagde gegevens te worden ingevuld.

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project **Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer**
3. Titel van de NTS **Het testen van antistoffen tegen kanker**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - ~~wijziging van vergunning met nummer~~
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC **DEC-AMC**
 - telefoonnummer contactpersoon **[REDACTED]**
 - e-mailadres contactpersoon **[REDACTED]**
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken **24-11-2016**
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. Afstemming IvD

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Gestelde vraag/vragen
 - Datum antwoord

- Verstrek(t)e antwoord(en)
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

>Ja

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft

> een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

> Ja

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

> Nee

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling ("to identify antibodies that impair tumor growth and/or spreading *in vivo*, or eliminate the tumor cells all together".) en kan getypeerd worden als een project met een hoofd- en één subdoel, waarvan het subdoel nodig is voor het behalen van het hoofdoel. Het hoofdoel zal voorafgegaan worden door het subdoel:

i) het ontwikkelen van een humane tumor transplantatie muismodel (tumor xenograft mouse model). Voor elke tumor zullen er tumorcellen (afkomstig uit celkweek, patiëntmateriaal of organoiden) in een muis gebracht worden om die specifieke tumor uit te laten groeien. In sommige gevallen hebben tumoren stromale cellen nodig om te kunnen groeien. In die gevallen zullen deze cellen ook toegediend worden.

ii) Het testen van de effectiviteit van antilichamen op hun therapeutische potentie. In het ontwikkelde tumormodel zal bepaald worden of de in-vitro geselecteerde antilichamen de groei en uitzaaiing van de tumor kunnen remmen of voorkomen. Eerst zullen alleen de antilichamen getest worden, maar later ook conjugaten van het antilichaam met bijvoorbeeld medicijnen of antilichamen voor andere immuuncellen (cytotoxische T of NK cellen). Het subdoel moet eerst behaald worden voordat het hoofdoel kan worden bereikt en zijn dus tijds- en uitkomstafhankelijk van elkaar. De twee doelen zijn volledig en duidelijk uitgewerkt. Dit maakt de aanvraag tot een navolgbaar geheel. Het project is haalbaar, afgaande op het voorwerk en de uitgebreide ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de doelen te bereiken.
Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.
> Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
> De aangekruiste doelcategorie "translationeel onderzoek" sluit aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt gezocht naar antilichamen die therapeutisch potentie hebben voor het behandelen van tumoren.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).
> Het directe doel van het project is het ontdekken van antilichamen die tumorgroei en uitzaaiing kunnen remmen of voorkomen. Het uiteindelijke doel is het bijdragen aan een behandeling tegen kanker met deze antilichamen.
Het betreft hier translationeel onderzoek. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*).
> De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op het ontdekken van antilichamen die tumor groei en uitzaaiing kunnen voorkomen of remmen, zijn de proefdieren, de onderzoekers en, op termijn, kankerpatiënten.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen stress en pijn ondervinden gedurende de proeven. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: de onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.

Waarden die voor kankerpatiënten en hun sociale netwerken bevorderd worden: het ontwikkelen van een nieuwe behandelingsmethode waardoor de genezingskansen zullen toenemen.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.
> Er is geen sprake van substantiële milieueffecten, voorzover de DEC dit kan overzien.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

> De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van deskundigheid en kennis.

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de transplantatie van tumorweefsel in muizen. Hierdoor heeft de groep de expertise in huis om alle voorgestelde proeven uit te kunnen voeren en is er voldoende kunde in huis om aan de-3V beginselen te kunnen voldoen. Alle dierproeven worden door een vast en toegewijd team uitgevoerd. Het lab is gespecialiseerd in het isoleren en karakteriseren van nieuwe antilichamen tegen virale, bacteriële en tumor doelwitten. Sommige antilichamen tegen infectieuze ziektes worden reeds in een fase 2/3 studie getest.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

> De opzet van het project en van de experimenten die worden ingezet voor elk van de doelen, is logisch en goed te begrijpen. Voor de start van de in-vivo proeven, wordt in-vitro eerst bepaald of de antilichamen reactiviteit laten zien tegen de tumoren en vrijwel geen reactiviteit tegen gezond weefsel. De uitkomstparameters van de in-vivo proeven zijn in het perspectief van het directe doel volstrekt logisch: al of geen groei van een bepaalde tumor in de muis (subdoel) en de mate van tumorremming door elk van de specifieke antilichamen die zullen worden getest (hoofddoel). Er is hier sprake van een project met heldere onderzoeksopzet, die aansluit bij de gestelde doelen. De DEC verwacht dan ook dat de doelstellingen bereikt kunnen worden.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

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

> Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

> Er is voldaan aan bijlage III

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

> Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC acht de inschatting realistisch.

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

> De "heelheid" van het dier wordt niet zodanig aangetast dat sprake is van vermindering of ontneming van soortspecifieke eigenschappen of van ernstige pijn. Het dier blijft in staat om binnen de context van huisvesting en experiment zelfstandig te functioneren.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd, en de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken (door tumor groei of "graft vs host" ziekte) is, op basis van ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat. Tumoren die te groot zijn, worden verwijderd en minder dan 5% van de dieren ontwikkelt "graft vs host" ziekte.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De aanvrager geeft aan dat tumorcellen in-vitro veranderen en geen goede afspie-

geling geven van het tumor gedrag in patiënten. Daarnaast valt uitzaaiing niet te bestuderen in vitro. Vervanging van de dierproeven is hierdoor niet mogelijk, maar waar mogelijk maken de onderzoekers gebruik van in vitro experimenten om de meest veelbelovende antilichamen te selecteren en zo het aantal proefdieren te verminderen. De DEC vindt dat de aanvrager het voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen vervangingsalternatieven mogelijk zijn voor deze vraagstellingen.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De aantallen dieren voor het ontwikkelen van de tumor modellen zijn stapsgewijs ingeschat, zonder statistiek. En zijn gebaseerd op de aanwezige capaciteit om 5 modellen per jaar te kunnen testen. Er wordt eerst in twee dieren gekeken of een tumor gaat groeien. Op basis van deze resultaten wordt het protocol aangepast en worden twee nieuwe muizen getransplanteerd met tumor weefsel. Er wordt verwacht dat er minder dan 5 rondes nodig zijn om een model te verkrijgen. Dan worden er nog 10 extra muizen gebruikt ter validatie van het model. Alleen als er meer dan 80% van de dieren een tumor ontwikkelen zal het model gebruikt worden voor de vervolproeven met antilichamen.

Het aantal dieren in deze vervolproeven is berekend op basis van een power van 80% en een tweezijdige alpha van 0.05. De remming van tumorgroei zou meer moeten zijn dan 50%. De standaarddeviatie is voor ieder tumor model verschillend en zal op basis van een pilot experiment met 5 muizen bepaald worden. Hierdoor wordt een realistische schatting gemaakt voor het aantal dieren dat nodig is om een statistisch significant verschil te behalen.

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

> De antilichamen worden eerst in-vitro gekarakteriseerd waardoor alleen dierproeven gedaan worden met antilichamen met de hoogste potentie om in vivo tumor groei te remmen. Er worden immunodeficiente muizen, genetisch gemodificeerde muizen en Human Immune System muizen gebruikt om de tumorgroei zo goed mogelijk (gelijkend op de humane situatie) te bestuderen. Door gebruik van reporters in tumorcellen kan de groei en metastasering van tumoren worden gemeten met behulp van non-invasieve afbeeldingstechnieken. Dit draagt bij aan zowel de verfijning als aan vermindering van het aantal proefdieren. De humane eindpunten zijn duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

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

> n.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De aanvrager geeft aan dat van bepaalde tumoren bekend is dat ze in één van de geslachten minder goed aanslaan. In zulke gevallen wordt alleen het geslacht gebruikt waarin de tumoren goed groeien. Als bepaalde tumoren in beide geslachten even goed groeien, kunnen in principe beide geslachten in gelijke aantallen worden gebruikt. Bij muizen die binnen de eigen proefdierfaciliteit kunnen worden gefokt, zal dit ook worden gedaan. Als muizen bij een commerciële fokker moeten worden besteld, treedt er bij de mannelijke muizen veel vechten op, wat het gebruik in experimenten ernstig belemmert; in dat geval zullen alleen vrouwelijke muizen worden gebruikt.

De DEC acht deze overwegingen, argumenten en gemaakte keuzes correct. Het vechten van mannelijke muizen levert stress op die de uitkomst van de experimenten zal kunnen beïnvloeden. Het individueel huisvesten van mannelijke muizen is om twee redenen geen oplossing: a. individuele huisvesting voor langere tijd resulteert in een ernstig stress syndroom, dat eveneens de waarde van de experimenten zou ondergraven; b. als de mannelijke muizen individueel moeten worden gehuisvest, moeten ook alle vrouwelijke muizen individueel worden gehuisvest, omdat anders de resultaten uit mannelijke muizen niet vergelijkbaar zouden zijn met die uit vrouwelijke muizen. c. daarnaast is het praktisch onuitvoerbaar vanwege het grote ruimtebeslag (10x zo groot als bij groepshuisvesting).

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- > De dieren worden in het kader van de proef gedood volgens een methode van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doden is noodzakelijk omdat in het kader van het experiment de weefsels uit het dier moeten worden gehaald voor analyse.
20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.
- > n.v.t.

NTS

20. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?
- > Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

Rechtvaardigt het verkrijgen van antilichamen met een tumor remmende werking en/of uitzaaiing voorkomende antilichamen, het geringe tot ernstige ongerief dat de muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op *het verkrijgen van antilichamen met een remmende werking op tumorgroei of uitzaaiing*, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op langere termijn bestaan de belanghebbenden uit de groepen patiënten die lijden aan verschillende soorten kanker.

De 5600 proefdieren worden door dit onderzoek geschaad omdat het pijn en stress veroorzaakt. De dieren zullen licht (36%), matig (62,6%) tot maximaal ernstig (1.4%) ongerief ondergaan.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen kennis en inzichten krijgen over de werking van antilichamen in het remmen van tumor groei en uitzaaien door dit onderzoek, wat gedeeld wordt met het wetenschappelijke veld. Op die manier wordt bijgedragen aan de ontwikkeling van het vakgebied. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenten.

De waarden en belangen van patiënten spelen ook een belangrijke rol in dit translationele onderzoek. De identificatie van deze antilichamen kan een belangrijke bijdrage leveren aan het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor kanker. Deze techniek wordt al onderzocht in fase 2/3 studies gericht op het behandelen van infectieuze ziekten. De toepassing van deze kennis zou in de nabije toekomst een realistische optie kunnen zijn, maar behoort niet tot het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Het ongerief dat de dieren zullen ondergaan acht de DEC gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. De DEC waardeert het identificeren van deze antilichamen, en daarmee het maatschappelijk belang in het ontwikkelen van nieuwe kankertherapieën, als het meest zwaarwegende gevolg dat tegenover het ongerief van de 5600 muizen staat.

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

Het testen van antistoffen tegen kanker

De DEC is van mening dat het belang van het identificeren van antilichamen die tumorgroei en/of uitzaaiing en de bijdrage aan therapeutische verbeteringen voor kanker (het maatschappelijke belang), het geringe (36%), matige (62.6%) tot ernstige (1.4%) ongerief dat de in totaal 5600 muizen als proefdieren in dit onderzoek zullen ervaren, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Om dit doel te bereiken worden immuundeficiëntie, transgene en Humaan immuunsysteem muizen als proefdieren gebruikt. De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen per techniek (zie tabel in appendix 1 onder punt D, veel ervaring met de modellen, duidelijk geformuleerde humane eindpunten, er wordt anesthesie en analgesie toegepast tijdens de operaties, de kans op graft versus host ziekte wordt verlaagd door deze experimenten in een korte tijdspanne uit te voeren zodat de ziekte zich niet kan ontwikkelen).

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van deze doelstellingen binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. De groep beschikt over veel ervaring met de HIS muis en met de verschillende tumormodellen. Een vast en toegewijd team zal de dierproeven uitvoeren, waardoor alle kennis en kunde in huis is. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

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

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

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

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het advies is in de DEC vergadering unaniem tot stand gekomen.

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

Dit is niet van toepassing, daar dit valt onder de vertrouwelijkheid binnen de DEC conform artikel 5 van haar reglement, maar voor zover relevant is deze verwerkt in de ethische afweging onder D. Daarenboven is de DEC niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**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
AVD118002016795
Bijlagen
1

Datum 22 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 19 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer" met aanvraagnummer AVD118002016795. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u een kleine tekstuele aanpassing in de NTS doorgevoerd.

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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een project een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Beoordeling achteraf dient plaats te vinden vanwege ernstig ongerief bij een deel van de dieren.

Datum:
22 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002016795

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 19 december 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. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. 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:

Datum:
22 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002016795

[REDACTED]
ir. 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: Academisch Medisch Centrum
Adres: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, voor het project "Preclinical testing of the efficacy of monoclonal antibodies against human cancer" met aanvraagnummer AVD118002016795, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Senior Scientist. Voor de uitvoering van het project is Scientist verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 19 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 december 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 19 december 2016, ontvangen op 19 december 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Setup tumor xenograft models / Xenograft				
	Muizen (Mus musculus) / Immunodeficiente en transgene muizen	500	1% Ernstig 63% Matig 36% Licht	
3.4.4.2 Antibody efficacy testing				
	Muizen (Mus musculus) / zie appendix 3.4.4.1	5.100	1% Ernstig 63% Matig 36% Licht	

Aanvraagnummer:

AVD118002016795

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD118002016795

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

Aanvraagnummer:

AVD118002016795

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.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.