

		Inventaris Wob-verzoek W17-11								
			wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.		document NTS 20171632	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Origineel aanvraagformulier				x		x		
2		NTS initieel			x					
3		Projectvoorstel				x	x			
4		Bijlage beschrijving dierproeven initieel				x	x			
5		DEC-advies				x	x			
6		Ontvangstbevestiging				x		x		
7		Verzoek om aanvullende informatie				x		x		
8		NTS aangepast	x							
9		Bijlage beschrijving dierproeven aangepast				x	x			
10		Adviesnota CCD		x						x
11		Beschikking en vergunning				x		x		

03 MEI 2017



1.

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?

Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500

☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen

- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht
--------------------------------	-------------

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
---	------------

KvK-nummer	30244197
------------	----------

- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

Straat en huisnummer	Instatie voor Dierenwelzijn
----------------------	-----------------------------

Postbus	12007
---------	-------

Postcode en plaats	3501AA
--------------------	--------

IBAN	NL27INGB0000425267
------	--------------------

Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
---------------------------------------	----------------------

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☒ Dhr.	☐ Mw.
-----------------------------	------------	--	------------------------------

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

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

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

E-mailadres	[REDACTED]
-------------	------------

- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	☐ Dhr.	☒ Mw.
-----------------------------	------------	-------------------------------	---

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

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] - [REDACTED]	Dhr. ✓ Mw.
	Functie	[REDACTED]	
	Afdeling	[REDACTED]	
	Telefoonnummer	[REDACTED]	
	E-mailadres	[REDACTED]	

1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

☒ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag

☐ Nee

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

Nee > Ga verder met vraag 3

2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 01 - 07 - 2017

Einddatum 01 - 07 - 2022

3.2 Wat is de titel van het project?

Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening

3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Ontwikkeling van holmium bolletjes voor behandeling van tumoren

3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC

Postadres

E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 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
- ☒ Bijlage Beschrijving dierproeven

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- | | |
|------------------------------|---|
| 1.1 Titel van het project | Ontwikkeling van holmium bolletjes voor behandeling van tumoren |
| 1.2 Looptijd van het project | Vijf jaar |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Holmium, bolletjes, kanker, behandeling |

2 Categorie van het project

- | | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.

<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | ☒ Fundamenteel onderzoek |
| | ☒ Translationeel of toegepast onderzoek |
| | ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie |
| | ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier |
| | ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort |
| | ☐ Hoger onderwijs of opleiding |
| | ☐ Forensisch onderzoek |
| | ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven |

3 Projectbeschrijving

- | | |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | <p>Binnen het kankeronderzoek heeft deze onderzoeksgroep in het verleden een nieuw medisch hulpmiddel ontdekt: radioactieve holmium-bolletjes. Na proefdieronderzoek werden deze bolletjes uiteindelijk geschikt bevonden voor het behandelen van patiënten met tumoren in de lever. Daarnaast is deze vinding in een bedrijf verder ontwikkeld waardoor deze behandeling in patiënten wereldwijd toegepast kan gaan worden. In dit nieuwe dierproefproject zal worden onderzocht of de bolletjes ook gebruikt kunnen worden bij andere vormen van kanker. Omdat de hoeveelheid holmium in de bolletjes erg laag is, hebben we nieuwe holmiumbolletjes ontwikkelt en deze in het laboratorium uitgebreid getest op cellen en op 'slachtafval'. Hierdoor hebben we een beeld van hoe deze deeltjes zich gedragen in het weefsel.</p> <p>Voordat deze nieuwe bolletjes als behandeling van kanker in de mens toegepast mag worden, is het belangrijk om van de nieuwe bolletjes het gedrag in het lichaam te weten. Om de veiligheid en het precieze behandelingseffect in kaart te brengen is het testen in dieren (met en zonder tumoren) een onvermijdelijke en essentiële stap.</p> <p>Dit onderzoek heeft concreet de volgende onderzoeksdoeleinden:</p> <ul style="list-style-type: none">- het optimaliseren van de nieuwe holmiumbolletjes, waarbij het uiteindelijke doel is een verbetering van de lokale behandeling van de tumor.- Na uitgebreid testen in 'slacht afval' wordt de reactie van het weefsel onderzocht door de verdeling in de tumor te bepalen. (rat)- Het bepalen van de effect van holmium bolletjes op de groei van een tumor (konijn)- Als laatste wordt gekeken of de toediening van deze holmiumbolletjes op de langere termijn schade aan omliggende gezonde weefsels of organen geeft. (muis en konijn) <p>In deze aanvraag worden maximaal vier nieuwe holmiumbolletjes met hierbij twee mogelijke toedieningsvloeistoffen.</p> |
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | <p>In dit onderzoek zal uitvoerig worden onderzocht hoe stabiel de holmium bolletjes zijn, hoe goed deze werken tegen kanker en hoe veilig de bolletjes zijn. Indien er veelbelovende resultaten worden behaald, zullen de bolletjes ook gebruikt gaan worden bij toekomstige patiënten.</p> |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | <p>Totaal worden er maximaal 1200 muizen; 850 ratten en 346 konijnen ingezet in deze studie.</p> |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | <p>Hoewel het noodzakelijk is om in een deel van de gebruikte dieren tumoren te laten groeien zullen ze hier weinig last van ondervinden. De tumoren zullen klein zijn en nauw in de gaten worden gehouden. Alle handelingen die pijn of beangstigend kunnen zijn worden onder een roesje of met pijnstilling uitgevoerd. De meeste voorkomende ongerief zal zijn het ontwaken uit narcose. Narcose is noodzakelijk om beeldvorming uit te voeren of pijnloos de holmium bolletjes toe te dienen.</p> |

3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	De dieren zullen matig ongerief ondervinden.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren worden dood gemaakt om aan het eind van het experiment de tumoren te onderzoeken en het omliggende weefsel en organen te controleren op eventuele schade ten gevolge van de behandeling.

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Voordat de bolletjes in de dieren worden getest zijn ze eerst uitgebreid onderzocht door experimenten op het laboratorium. Hierbij kan men denken aan celkweek experimenten en ex-vivo experimenten ('slacht afval') Maar uiteindelijk is kanker – naast een veel voorkomende – ook een ingewikkelde ziekte. Hierdoor zijn de resultaten uit het laboratorium niet goed vergelijkbaar met hoe dit in het 'levende wezen' is. Het is daarom niet mogelijk om alleen bij 'reageerbuis experimenten' te blijven. Indien we werkelijk willen weten hoe deze bolletjes tegen kanker werken en wat de bijwerkingen zijn is het testen in dieren noodzakelijk.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Er wordt op basis van berekeningen gewerkt met het minimaal aantal dieren om een uitspraak te kunnen doen over de werkzaamheid van de behandeling.
4.3	Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest	Omdat het binnen het beschreven onderzoek noodzakelijk is om tumoren te groeien in de dieren is ervoor gekozen om de tumoren zo klein mogelijk te houden. De dieren worden dan ook regelmatig hierop gecontroleerd. Wanneer blijkt dat het dier hier ongerief van gaat ondervinden (wat van te voren valt te voorspellen en dus te voorkomen) laten we het dier inslapen om onnodig ongerief te voorkomen. Indien nodig krijgen de dieren pijnstilling.

verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Op het moment dat er holmium-bolletjes injecties worden gegeven, scans plaats vinden of andere ingrijpende handelingen worden uitgevoerd wordt er gebruik gemaakt van verdoving om zo alle stress en ongemak te beperken.

De dieren worden regelmatig gehandeld om dit niet als een stressvolle ervaring te laten ervaren.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Verdoving, pijnstilling en regelmatige controle op het welzijn van het dier.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- ☒ Fundamenteel onderzoek
- ☒ Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Sinds 1994 is er intensief onderzoek gedaan naar radioactieve microsferen voor de behandeling van verschillende oncologische maligniteiten. De microsferen die werden ontwikkeld voor de behandeling van levertumoren werden in 2009 voor het eerst in patiënten toegepast. Sindsdien zijn ruim 80 patiënten behandeld in een fase-1, fase-2 en twee toegepaste klinische studies. (ref. **1-4**) De onderzoeksgroep heeft zich altijd op translationeel onderzoek gericht om ideeën uiteindelijk voor patiënten wereldwijd toegankelijk te maken. De holmium microsferen voor behandeling van levertumoren hebben dit traject doorlopen en worden nu in de markt gezet. Mede op grond van de onderzoeksresultaten die verkregen zijn bij dierexperiment kregen de holmium microsferen op 1 april 2015 een Conformité Européenne (CE) registratie, waardoor ze commercieel verkocht mogen worden in heel Europa.

De eerst ontwikkelde Holmium microsferen zijn de Holmium-PLLA-microsferen. Deze microsferen zijn door M. Smits et al [ref. **4**] in een fase 1 studie (genaamd de HEPAR-1, welke een typische dosisescalatiestudie was en uitgevoerd werd in 15 patiënten) onderzocht op veiligheid bij patiënten met lever metastases. Hierbij is in een oplopende radioactiviteit dosis 166-Holmium-PLLA-microsferen (20, 40, 60 en 80 Gy) via de lever-slagader in de lever geïnjecteerd. Uit deze studie kan worden geconcludeerd dat de toediening van 166-Holmium-PLLA-microsferen veilig toegepast kon worden bij een maximale dosis van 60 Gy over de gehele lever.

De effectiviteit van de Ho-PLLA-microsferen is verder onderzocht in een fase 2 studie (genaamd HEPAR-2, effectiviteitsstudie in 38 patiënten) door J.F. Prince et al [10]. Hierbij is het effect van de 166-Holmium-PLLA-embolisatie behandeling op patiënten met lever metastasen beoordeeld. Hiervoor zijn er vooraf "target laesies" aangeduid die in de tijd m.b.v. scans worden gevolgd. Hierbij werd er bij meer dan 70% van de vooraf aangewezen "target laesies" ziektecontrole waargenomen. In deze studie werd een mediale overleving van 14 maanden gevonden, in een vergelijkbare studie met Yttrium microsferen een overleving van 8.8 maanden. De bijwerkingen waren hoofdzakelijk abdominale pijn en moeheid.

Bij de hierboven vermelde toepassing van oncologische maligniteiten worden de [REDACTED] microsferen toegediend door middel van katherisatie, om zo tumoren via de bloedbaan te bereiken. Sinds 2006 wordt er echter ook onderzoek gedaan om [REDACTED] microsferen toe te dienen in tumoren d.m.v. een intra-tumorale injectie.

Om de effectiviteit van de [REDACTED] microsferen te bepalen bij intra-tumorale toediening zijn we een studie gestart met het intra-tumoraal toedienen van [REDACTED] microsferen aan huisdieren met tumoren aan de tong. (plaveiselcelcarcinoom) De diagnose wordt vaak pas laat gesteld, waardoor complete chirurgische verwijdering niet meer mogelijk is. In een studie verband hebben we deze dieren behandeld met een – in een oplopende dosis radioactiviteit - intra-tumorale injecties met [REDACTED] microsferen. De behandeling kon succesvol worden toegepast bij deze veterinaire patiënten. Hierbij werd bij 27% compleet respons gezien, 36% partiële respons, en 18% stabiele ziekte. In deze studie was een duidelijke relatie tussen de toegediende dosis [REDACTED] microsferen en de uitkomst. In eerdere studies met external beam bestraling van deze groep dieren werden er meer complicaties gezien ten opzichte van

deze studie. Article in press [11].

Het succes in deze dierpatiënten heeft daarom ertoe geleid dat de microsferen in 2016 ook humaan zullen worden toegepast bij patiënten met hoofd en hals tumoren.

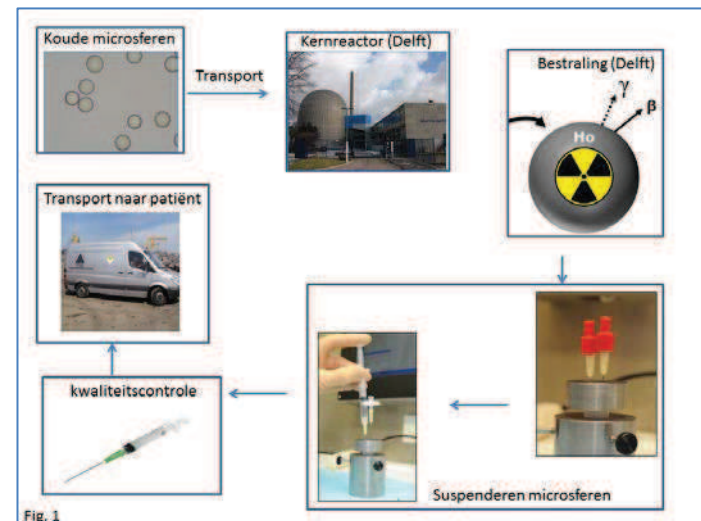
Om de therapie effectiever te maken, willen we kijken naar de mogelijkheden tot het ontwikkelen van [REDACTED] microsferen die een [REDACTED] met [REDACTED] hebben. De nu gebruikte verbinding bevat een [REDACTED]-content [REDACTED]. Echter het is ook mogelijk om [REDACTED] microsferen te maken dit tot wel [REDACTED] of met een nog hogere belading. Voorbeelden hiervan zijn [REDACTED] (ref. 5-8) of [REDACTED] (ref. 9). Echter nieuwe ontwikkelingen zijn gaande. De voordelen van microsferen met een hogere [REDACTED]-content is dat de deeltjes meer activiteit per deeltje bevatten (hogere specifieke activiteit) en daarmee een hogere dosis kan worden toegediend terwijl het volume suspensie niet groter wordt. Dit heeft ook logistieke voordelen.

De half waarde tijd ($T_{1/2}$) van [REDACTED] is [REDACTED]. Het transport van de microsferen en het opwerken voor toediening aan de patiënt kost tijd. Bij een hogere activiteit per microsfeer duurt het langer voordat deze microsferen te ver zijn vervallen, dus is er meer tijd voor transport en opwerken van de microsferen. Het is nu niet altijd mogelijk om de benodigde dosis op tijd bij patiënten te krijgen gezien de afstand tussen reactor, duur van de opwerking en de locatie van het ziekenhuis. (zie fig. 1)

Bij deze studie worden de verschillende formuleringen (microsferen en de gebruikte toedieningsvloeistof) eerst in-vitro uitvoerig getest. Bij de verschillende formuleringen zijn ook verschillende toedieningsvloeistoffen van belang. Immers de verschillende chemische samenstellingen van de microsferen kan een andere samenstelling van een toedieningsvloeistof vereisen. De formuleringen worden dan ook eerst op "[REDACTED] microsferen" volledig getest: in-vitro op holmiumcontent, oppervlakte, compositie en stabiliteit getest. Daarna op "[REDACTED] microsferen" [REDACTED] op specifieke activiteit, stabiliteit na bestralen, oppervlakte en samenstelling na bestralen. Na alle in-vitro onderzoeken zullen er nog ex-vivo experimenten plaats vinden op 'slachtafval-organen' - om de meest optimale combinatie van microsfeer en toedieningsvloeistof te onderzoeken met de daarbij verdeling over organen (μCT).

Uiteindelijk zullen de vier meest optimale holmium microsfeer formuleringen uiteindelijk in-vivo verder worden onderzocht op bio-distributie, toxiciteit (niet te verwachten) stabiliteit, lekkage en bio-compatibiliteit in-vivo volgens het hieronder omschreven projectvoorstel.

- [1] J. F. W. Nijsen, B. A. Zonnenberg, J. R. W. Woittiez, D. W. Rook, I. A. S. Woudenberg, and P. P. Van Rijk, "Original article Holmium-166 poly lactic acid microspheres applicable for intra-arterial radionuclide therapy of hepatic malignancies : effects of preparation and neutron activation techniques," vol. 26, no. 7, 1999.
- [2] F. Nijsen, D. Rook, C. Brandt, R. Meijer, H. Dullens, B. Zonnenberg, J. De Klerk, P. Van Rijk, W. Hennink, and F. Van het Schip, "Targeting of liver tumour in rats by selective delivery of holmium-166 loaded microspheres: A biodistribution study," *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 28, pp. 743–749, 2001.
- [3] S. W. Zielhuis, J. F. W. Nijsen, R. de Roos, G. C. Krijger, P. P. van Rijk, W. E. Hennink, and A. D. van het Schip, "Production of GMP-grade radioactive



- holmium loaded poly(L-lactic acid) microspheres for clinical application.*," Int. J. Pharm., vol. 311, no. 1–2, pp. 69–74, Mar. 2006.
- [4] M. L. J. Smits, J. F. W. Nijsen, M. A. A. J. van den Bosch, M. G. E. H. Lam, M. A. D. Vente, W. P. T. M. Mali, A. D. van Het Schip, and B. A. Zonnenberg, "Holmium-166 radioembolisation in patients with unresectable, chemorefractory liver metastases (HEPAR trial): A phase 1, dose-escalation study," *Lancet Oncol.*, vol. 13, pp. 1025–1034, 2012.
- [5] W. Bult, M. A. D. Vente, E. Vandermeulen, I. Gielen, P. R. Seevinck, J. Saunders, A. D. van het Schip, C. J. G. Bakker, G. C. Krijger, K. Peremans, and J. F. W. Nijsen, "Microbrachytherapy using holmium-166 acetylacetonate microspheres: A pilot study in a spontaneous cancer animal model," *Brachytherapy*, vol. 12, pp. 171–177, 2013.
- [6] P. Seevinck, W. Bult, J. Nijsen, M. Vente, R. Roos, A. van het Schip, and C. Bakker, "Highly-loaded holmium microspheres for test dose detection and biodistribution prediction in internal radiation therapy of liver malignancies," in *Proceedings 16th Scientific Meeting, International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 2008, vol. Toronto, p. 274.
- [7] W. Bult, P. R. Seevinck, G. C. Krijger, T. Visser, L. M. J. Kroon-Batenburg, C. J. G. Bakker, W. E. Hennink, A. D. Van Het Schip, and J. F. W. Nijsen, "Microspheres with ultrahigh holmium content for radioablation of malignancies," *Pharm. Res.*, vol. 26, pp. 1371–1378, 2009.
- [8] W. Bult, R. Varkevisser, F. Soulimani, P. R. Seevinck, H. De Leeuw, C. J. G. Bakker, P. R. Luijten, A. D. Van Het Schip, W. E. Hennink, and J. F. W. Nijsen, "Holmium nanoparticles: Preparation and in vitro characterization of a new device for radioablation of solid malignancies," *Pharm. Res.*, vol. 27, pp. 2205–2212, 2010.
- [9] W. Bult, H. de Leeuw, O. M. Steinebach, M. J. van der Bom, H. T. Wolterbeek, R. M. a Heeren, C. J. G. Bakker, A. D. van Het Schip, W. E. Hennink, and J. F. W. Nijsen, "Radioactive holmium acetylacetonate microspheres for interstitial microbrachytherapy: an in vitro and in vivo stability study.," *Pharm. Res.*, vol. 29, no. 3, pp. 827–36, Mar. 2012.
- [10] Proefschrift J.F.Prince "Holmium radioembolization; efficacy and safety", Chapter 6: "Efficacy of radioembolization with 166-Ho microspheres in lever metastases"; (p92-111) ISBN 978-90-393-6489-5; Feb. 2016. Manuscript in progress.
- [11] S.A. van Nimwegen; R.C. Bakker; J.Kirpensteijn; R.J.J. van Es; R.Koole; M.G.E.H. Lam; J.W.Hesselink; J.F.W. Nijsen; "Intratumoral injection of radioactive Holmium (166Ho) microspheres for effective treatment of oral squamous cell carcinoma in cats". Article submitted, final decision.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het doel van het totale project is de mogelijkheid om formuleringen met ██████████ in-vivo te testen op stabiliteit, biocompatibiliteit, toxiciteit en effectiviteit bij konijnen, ratten en muizen. Hierbij worden de microsferen zowel zonder ██████████ activatie ("████████" als na ██████████ activatie, dus als ██████████ microsfeer ("████████" onderzocht.

Met ██████████ microsferen die een ██████████ hebben, kunnen met een ██████████ per microsfeer met minder injectievolume, maar wel gelijke specifieke geabsorbeerde dosis, toegediend worden. Dit is een groot voordeel voor de patiënt- aangezien de hogere activiteit waarschijnlijk een betere tumor behandeling geeft en ook zorgt voor minder lekkage vanwege het kleinere benodigde volume dat hoeft worden toegediend in de tumor. Daarnaast kan

de hogere [REDACTED] gebruikt worden voor een flexibele logistiek. De half waarde tijd ($T_{1/2}$) van [REDACTED] is [REDACTED]. Het transport van de microsferen en het opwerken voor toediening aan de patiënt kost tijd. Bij een hogere activiteit per microsfeer duurt het langer voordat deze microsferen te ver zijn vervallen, dus is er meer tijd voor transport en opwerken van de microsferen. Het is nu niet altijd mogelijk om de benodigde dosis op tijd bij patiënten te krijgen gezien de afstand tussen reactor, duur van de opwerking en de locatie van het ziekenhuis.

Om dit mogelijk te maken moeten deze nieuw ontwikkelde microsferen worden geoptimaliseerd voor gebruik in-vivo, getest worden op biocompatibiliteit, veiligheid, stabiliteit, verdeling in het tumorweefsel en de effectiviteit op de tumor.

Al het voorgestelde onderzoek zal bij kunnen dragen aan registratie van deze microsferen in het zogenaamde "design History File" dat een belangrijk onderdeel zal vormen van een [REDACTED]. Daarnaast zullen de biocompatibiliteit en effectiviteit een essentieel stuk vormen in de [REDACTED]

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Als chirurgische verwijdering van maligniteiten geen optie is, blijven alleen radiotherapie en systemische behandelingen over als alternatieve behandelingen. Echter in enkele specifieke gevallen zijn deze opties maar beperkt beschikbaar of hebben ze maar beperkte effect op de overleving. Mogelijkheden zoals intra-tumorale injecties met radioactieve microsferen kunnen dan overwogen worden. Dit is een lokale toediening, waarbij er minder bijwerkingen te verwachten zijn. Echter om deze behandelingstechniek effectiever te maken is er een [REDACTED] microsferen met een [REDACTED] en daarmee een hogere radioactiviteit noodzakelijk. Op grond van deze ervaringen, zowel in veterinaire patiënten als in humane patiënten willen we deze nieuwe [REDACTED] microsferen onderzoeken op biocompatibiliteit, veiligheid, stabiliteit (ook na activatie met neutronen), verdeling over de tumor en de effectiviteit op experimentele tumoren.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Hierbij willen we de volgende onderzoeks-strategie volgen:

Fase 1: In-vitro ontwikkeling en testen van nieuwe microsferen en toedieningsvloeistoffen (*al een lopend proces*)

- 5 tot 6 nieuw ontwikkelde [REDACTED] microsferen met een [REDACTED] ontwikkelen en in-vitro / ex-vivo onderzoeken op compositie, stabiliteit en verdeling m.b.v. [REDACTED]
- Deze combineren met verschillende toedieningsvloeistoffen. Immers verschillende microsferen zijn door hun verschillende chemische samenstelling beter of stabiel in een andere vloeistof. Uiteindelijk worden er maximaal vier microsferen verder onderzocht, met ieder twee – voor die microsfeer de meest - optimale toedieningsvloeistoffen.

Check: De optimale microsferen zijn microsferen waarbij de microsfeer goed intact blijft na bestraling en opwerken voor gebruik in de patiënt, met betrekking tot de grootte verdeling, uiterlijk, holmiumcontent en release. Hiervoor zijn duidelijke kwaliteitseisen geformuleerd.

Fase 2: Microsfeer [REDACTED] in tumoren: **(rat)**

- Bij de stabiele [REDACTED] microsfeer formulering wordt in-vivo getest op de biodistributie bij intra-tumorale toediening [REDACTED]
- Als proefdier is gekozen voor de rat omdat hiervoor tumormodellen beschikbaar zijn, waarmee in de onderzoeksgroep ervaring mee is. De tumoren in de rat zijn groot genoeg voor een technisch uitvoerbare lokale injectie van een suspensie van holmium microsferen.
- Als parameter wordt er (kwalitatief en kwantitatief) d.m.v. de [REDACTED] gekeken naar de verdeling van [REDACTED] microsferen.

Check: Als blijkt dat de microsferen een goede verdeling over de tumor laten zien, worden deze nieuwe microsferen verder meegenomen voor de bepaling van de optimale dosis en de effectiviteitsstudie. Hierbij wordt verder gegaan met microsfeer formuleringen die zich goed verdelen over de tumor. Microsfeer formuleringen met een slechte verdeling vallen hier af.

Fase 3: Optimalisatie behandeling en effectiviteit op de tumor: **(konijn)**

- Hierbij wordt gekeken naar de meest optimale dosis die nodig is voor een goede effect op de tumor. Hierbij wordt een oplopende dosis radioactiviteit over de groepen dieren toegediend. Na injectie vind er een scan plaats om te bepalen [REDACTED] verdeling in de dieren en controle op het eventuele doorschieten naar andere organen. Over de tijd wordt de [REDACTED] distributie gevolgd. De effecten op het tumorweefsel wordt gevolgd tot de tumor een omvang van 4* begin volume heeft. Bij deze experimenten wordt gebruik gemaakt van de tumor-donor dieren. (zie na de beschrijving fase 4)
- Als proefdier is gekozen voor het konijn omdat hiervan een bekend tumor model beschikbaar is. Daarbij zijn de tumoren groot genoeg om de effectiviteit van de radioactieve microsferen te onderzoeken. In deze fase ligt de nadruk op effectiviteit. Waarbij de dracht van het [REDACTED] is. Dit [REDACTED] kan alleen in goed in een grotere tumoren van ca. [REDACTED] in doorsnede worden getest.
- Als parameter voor effectiviteit wordt gekeken naar een verminderde tumor groei ten opzichte van de controle dieren.

Check: Als de microsferen bewezen effectief zijn, en dus een vertraging van de tumorgroei laten zien, wordt er naar de bio compatibiliteit van deze nieuwe microsferen gekeken.

Fase 4: bio-compatibiliteit van de microsferen en het supernatant: **(muis)**

- Bepalen [REDACTED] in het dier in een tijdreeks in organen bloed en urine van [REDACTED] microsferen. De microsferen of [REDACTED] wordt [REDACTED]. Hierbij kan gebruik gemaakt worden van beeldvorming om de [REDACTED] verdeling terug te vinden.
- Als proefdier is gekozen voor de muis. Dit proefdier wordt ook in de standaard biocompatibiliteitstesten gebruikt wereldwijd. De hoeveelheden [REDACTED] is aangepast aan de grootte van het proefdier.
- Als parameters voor biocompatibiliteit wordt gekeken naar gedrag, uiterlijk van de dieren en [REDACTED]. Afwijkend gedrag t.o.v. de blanco geïnjecteerde dieren wordt gescoord.

Tumor donordieren:

Deze dieren worden ingezet zodra fase 2 of 3 gestart wordt, of als andere projecten binnen onze onderzoeksgroep van deze donordieren gebruik gaan maken.

Voor het in vivo in kweek houden van de tumormodellen (zoals VX2 in het Konijn, zoals de R1 in de rat) voor onderdelen uit dit project zijn we genoodzaakt gebruik te maken van donordieren. Dat er voor deze tumorcellen donordieren nodig zijn, is omdat de tumoren gegroeid uit cellen niet direct te gebruiken zijn. De opbouw van de tumor is dan nog niet stabiel en varieert qua groei, vorm en necrotische haard. Pas na opkweek in een (tot twee) passages in het dier krijg je een stabiele goed gevasculariseerde tumor die transplanteerbaar is. Binnen het ■■■ zijn er andere onderzoekers die hier mogelijk voor hun onderzoek gebruik van kunnen maken. Dit heeft in het verleden tot vermindering van donor dieren geleid.

De VX2 tumor voor in het konijn is een tumor die al beschreven is in 1935 [12] en wordt gebruikt als tumormodel in de lever, hoofd/hals, pancreas baarmoeder, longen etc. [13-17]. De tumor groeit stabiel, is goed gevasculariseerd en is een alom gebruikt tumor model in het konijn, ook in de beeldvormende onderzoekslijnen. Met deze tumorlijn is veel ervaring binnen de groep. [14, 16]

Voor de ratten zijn er meerdere tumormodellen mogelijk zoals bijvoorbeeld de Nude-rat of WagRij rat met de R1-tumor (rhabdomyosarcoom). Deze is al heel lang in gebruik, is erg stabiel groeit en goed doorbloed is. [17-19]

- [12] P. Rous, J.W. Beard; *“the progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (shope) ”*; J. Exp. Med, 62; p523-548, 1935.
- [13] M.Nagatsu, T. Okagaki. R.M. Richart and A.Lambert; *Effects of Bleomycin on nuclear DNA in Transplantable VX-2 carcinoma of Rabbit*”; Cancer Research 31, 992-996, 1971.
- [14] J.F.W. Nijsen, J.H. Seppenwoolde, T. Havenith, C. Bos, C.J.G. Bakker, A.D. van het Schip; *“Liver tumors; MR imaging of radioactive holmium microspheres – phantom and rabbit study”*; Radiology 231, p491-499, 2004.
- [15] A.C. Eifler, R.J.Lewandowski, S.Virmani, J.C. Chung, D.Wang. R.L. Tang. B.Szolc-Kowalska, G.E. Woloschak, G.Y. Yang, P.K. Ryu, R.Salem, A.C. Larson, E. Cheon, M. Strouch, D.J. Bentrem and R.A. Omary; *“Development of the VX2 pancreatic cancer model in rabbits; a platform to test future interventional radiology therapies”*; J.Vasc Interv. Radil. 20(8); p1075-1082; 2009.
- [16] W. Bult, H. de Leeuw, O.M. Steinebach, M.J. van der Bom, H.Th. Wolterbeek, R.M.A. Heeren, C.J.G. Bakker, A.D. van het Schip, W.E. Hennik, J.F.W. Nijsen; *“Radioactive Holmium Acetylactonate microspheres for interstitial microbrachytherapy: an in-vitro and in-vivo stability study”*; Pharm. Res. 29; p827-836, 2012.
- [17] A. Parvinian, L.C. Casadaban, R.C. Gaba; *“Development, growth, propagation and angiographic utilization of the rabbit VX2 model of liver cancer: a pictorial primer and “how to” guide”*; Diagn. Interv. Radiology 20; p 335-340; 2014.
- [18] G.W.Barendsen, J.J.Broerse; *“Experimental Radiotherapy of a Rat Rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV X-Rays”*; Eur.J.Cancer Vol5, p373-391, 1969.
- [19] L.Dubois, W.Landuyt, K.Haustermans, P.Dupont, G.Bormans, P.Vermaelen, P.Flamen, E.Verbeke, L.Mortelmans.; *“Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model bij [F-18]-Fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry”*; B.J.of Cancer 91, p1947-1954, 2004.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

De volgende dierproef beschrijving wordt gebruikt voor de hierboven beschreven project:

01 Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie.

Deze dierproefbeschrijving bestaat uit vier fases:

fase 1:

in vitro ontwikkeling van nieuwe microsferen; uitgebreid getest in-vitro en ex-vivo

Fase 2:

Microsfeer distributie van de microsferen over de tumor na intra-tumorale toediening. (zowel [REDACTED] als [REDACTED] microsferen en supernatant/controle)

Fase 3:

Optimalisatie behandeling en effectiviteit op de tumor.

Fase 4:

Bio-compatibiliteit van de microsferen en het [REDACTED] door de [REDACTED] uit [REDACTED] microsferen in het dier te onderzoeken (tijdreeks)

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Gedurende de afgelopen jaren werden holmium beladen poly-melkzuur microsferen met een gemiddelde diameter van 30 micrometer ontwikkeld en getest in proefdieren, veterinaire patiënten en humane patiënten (bijna 70) en werden deze deeltjes CE gecertificeerd en binnen een bedrijf vercommercialiseerd voor behandeling van patiënten in Europa met levermaligniteiten. Als voorbereiding op deze projectaanvraag zijn [REDACTED] microsferen intra-tumoraal gebruikt bij 40 veterinaire patiënten, met veelbelovende resultaten.

In de beschreven projectaanvraag zullen de nieuw ontwikkelde [REDACTED] microsferen met [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] verder worden getest in vitro, ex-vivo en ook in-vivo om deze verder te ontwikkelen om toe te kunnen passen in de kliniek. Hierbij wordt gekeken naar de [REDACTED] van deze microsferen. Daarnaast naar de verdeling bij intra-tumorale injectie technieken en de werkzaamheid op experimentele tumoren. Het grote voordeel is dat de deeltjes een [REDACTED] hebben waardoor deze een hogere dosis straling kunnen bevatten. Ook wordt er onderzocht of de deeltjes een grotere stabiliteit bezitten als deze tot hoge dosissen worden [REDACTED].

Enkele belangrijke mijlpalen in dit onderzoek:

- **Fase 1:** Stabiele nieuw ontwikkelde microsferen met een optimale toedieningsvloeistof (= formulering) die in-vitro / ex-vivo worden uitgeselecteerd om verder in-vivo verder te onderzoeken om de vertaling naar de kliniek te kunnen maken.
 - GO als formuleringen aan alle eisen voldoet
 - minder dan [REDACTED] release hebben in-vitro
 - meer dan [REDACTED] content hebben op gewicht basis
 - tenminste [REDACTED] van hun volume distributie hebben tussen de beoogde gemiddelde diameter ± 5 micrometer
 - niet meer dan [REDACTED] beschadigde microsferen na neutronen activatie
- **Fase 2:** Bepalen bio distributie in experimentele tumoren (**rat**).
 - GO
 - als de dosis microsferen voor meer dan [REDACTED] in het tumorvolume aanwezig blijft.
- **Fase 3:** Bepalen effectiviteit op experimentele tumoren (**konijn**)
- → GO
 - als de duur voor de tumor 4* beginvolume bereikt gemiddeld $\geq (1.5 - 2) *$ zo lang duurt als zonder behandeling.
- **Fase 4:** Testen stabiliteit en bio compatibiliteit in vivo (**muus**). De formuleringen microsferen en toedieningsvloeistoffen worden verder getest op bio compatibiliteit na toediening van microsfeerbereiding of het supernatant van de bereidingen.

De komende jaren onderzoek bestaan uit optimalisatie. De jaren daarna zullen bestaan uit translatie.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe [REDACTED] microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>01</td><td>Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe [REDACTED] microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening.</td></tr></table>	Volgnummer	Type dierproef	01	Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe [REDACTED] microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening.
Volgnummer	Type dierproef					
01	Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe [REDACTED] microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening.					

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Alvorens de nieuw ontwikkelde [REDACTED] microsferen getransleerd kunnen worden naar de mens zijn enkele dierproeven noodzakelijk. De verschillende microsferen – als formulering in een toedieningsvloeistof - zullen eerst gekarakteriseerd worden volgens de volgende strategie:

Fase 1: in-vitro ontwikkeling en testen van nieuwe [REDACTED] microsferen (al een lopend proces)

De vier meest optimale microsferen met de daarbij behorende twee meest optimale toedieningsvloeistoffen per microsfeer worden verder mee genomen naar de in-vivo studie. Totaal [REDACTED].

Fase 2: microsfeer distributie over de tumor (**rat**)

- Na tumor implantatie (s.c.) en groei hiervan wordt er intra tumoraal [REDACTED] en [REDACTED] microsferen toegediend. Na de injectie wordt er een [REDACTED] gemaakt om de verdeling en eventuele 'doorschieten' te detecteren. Op een tijdsreeks wordt het dier opgeofferd en worden de tumoren en organen geïsoleerd om ex-vivo verder te analyseren of eerder als het HEP wordt bereikt.

Groepsindeling voor iedere microsfeer:

Maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee test toedieningsvloeistoffen per microsfeer; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; [REDACTED]*)

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] groepen per ontwikkelde microsfeer
[REDACTED]

Fase 3: effectiviteit van de microsfeer behandeling op de tumorgroei (**konijn**)

- Na tumor implantatie en tumor groei wordt er intra-tumoraal een oplopende dosis radioactiviteit toegediend om het effect op de tumor te bepalen. Na de toediening vindt er beeldvorming plaats om de [REDACTED] distributie te bekijken en te controleren of er geen eventuele lekkage van de activiteit heeft plaats gevonden. Dit kan direct of enkele dagen erna. Gedurende de follow-up wordt de tumorgroei gevolgd en worden er nog meer scans gemaakt om het verloop van de verdeling in beeld te krijgen (Beeldvorming [REDACTED] zichtbaar is). Als de tumor [REDACTED] het begin volume heeft bereikt of het HEP bereikt is wordt het dier getermineerd. Isolatie van tumor en organen voor ex-vivo analyse.

Maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee test toedieningsvloeistoffen per microsfeer; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; [REDACTED]*)

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] groepen per ontwikkelde microsfeer
[REDACTED]

Fase 4: Testen biocompatibiliteit in-vivo (**muis**)

Bepalen release van [REDACTED] in een tijdreeks na i.p. toedienen van microsfeer formuleringen, zowel [REDACTED] microsferen als [REDACTED] microsferen. Daarnaast wordt het supernatant van de formuleringen mee genomen. Als formulering wordt gezien de microsfeer (ms) + toedieningsvloeistof (td). Als controle wordt [REDACTED] mee genomen.

Groepsindeling: Voor microsfeer A (maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee toedieningsvloeistoffen per microsfeer; allen onafhankelijk van elkaar getest; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; ms-form. = microsfeer formulering; [REDACTED]*))

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] groepen per ontwikkelde microsfeer
[REDACTED]

Tot maximaal [REDACTED] maal per week wordt er bloed afgenomen (houdend aan de maximale toegestane hoeveelheid (8 ml/kg / 2 wk.)). Ook [REDACTED] [REDACTED] worden gecontroleerd op [REDACTED] content als algemene parameter [REDACTED] in vivo. Op vaste tijdstippen worden de dieren getermineerd – of eerder als het HEP wordt bereikt – en worden de relevante organen geïsoleerd en de biodistributie van [REDACTED] wordt hierin bepaald.

Donor dieren (rat en konijn)

Voor het in vivo in kweek houden van de tumormodellen (zoals VX2 in het Konijn, zoals de R1 in de rat) voor onderdelen uit dit project zijn we genoodzaakt gebruik te maken van donordieren. Dat er voor deze tumorcellen donordieren nodig zijn is omdat de tumoren niet direct uit cellen te gebruiken zijn. De opbouw van de tumor is dan nog niet stabiel en varieert qua groei, vorm en necrotische haard. Pas na opkweek in een (tot twee) passages in het dier krijg je een stabiele goed gevasculariseerde tumor die transplanteerbaar is. Binnen het [REDACTED] zijn er mogelijk andere onderzoekers die hier voor hun onderzoek gebruik van kunnen maken. Dit heeft in het verleden tot vermindering van donor dieren heeft geleid.

De VX2 tumor voor in het konijn is een tumor die al beschreven is in 1935 en wordt gebruikt als tumormodel in de lever, hoofd/hals, pancreas baarmoeder, longen etc.. De tumor groeit stabiel, is goed gevasculariseerd en is een alom gebruikt tumor model in het konijn, ook in de beeldvormende onderzoekslijnen. Met deze tumorlijn is veel ervaring binnen de groep.

Voor de ratten zijn er meerdere tumormodellen mogelijk zoals bijvoorbeeld de Nude-rat of WagRij rat met de R1-tumor (rhabdomyosarcom). Deze is al heel lang in gebruik, groeit erg stabiel groeit en is goed doorbloed.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Fase 2: microsfeer distributie over de tumor (rat; tumor)

- Onder anesthesie implantatie van tumorweefsel (zoals bv. De R1 tumor) in de flank[#]. Na tumor groei onder injectie anesthesie intra-tumorale injectie met [REDACTED] microsferen of [REDACTED] vloeistof gevolgd door een scan (extern). Gedurende de follow up - op indicatie – een extra scan (extern) onder injectie anesthesie. Op een reeks van tijdstippen anesthesie, bloedafname en terminatie^{##}. Isolatie van organen en tumoren voor [REDACTED] content en verdeling en histologie. (maximaal [REDACTED] tijdstippen; maximaal tot 21 dagen)

[#] : indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring bij de R1 tumor is dat 95% van de her-implantaties aanslaan.

^{##}: of eerder als het dier het Humane Eind Punt (HEP) dreigt te halen

Fase 3: Effectiviteit [REDACTED] microsfeer behandeling en microsfeer distributie over de tumor. (konijn; tumor)

- Na preventieve pijnstilling implantatie van tumorweefsel s.c. of i.m. op de achterpoot (of eventueel flank)[#]. Na voldoende tumorgroei transport naar extern, toedienen anesthesie en intra-tumorale injectie met oplopende dosis radioactieve microsferen gevolgd door scan (CT, MRI of echo).

Gedurende de follow-up worden er bloedafnames gedaan (maximaal [REDACTED] en extra scans onder anesthesie (extern; maximaal [REDACTED] Terminatie als de tumor 4* het begin volume (V0) is of eerder als HEP is bereikt (maximaal 45 dagen na behandeling). Isolatie van de tumor en organen voor ex-vivo analyse. (biodistributie [REDACTED] in de organen, histologie)

: Voorkeur voor implantatie s.c. echter in voorkomende gevallen slaat de tumor beter aan in de spier (meer bloedvoorziening).

: indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring bij de VX2 tumor is dat >65% van de her-implantaties aanslaan.

Fase 4: Testen biocompatibiliteit in-vivo

Bepalen [REDACTED] release in het dier gedurende de tijd (**muis**)

- Onder een roesje worden de microsferen i.p. toegediend.
- Regelmatige controle op welzijn en gedrag gedurende de follow-up. Afwijkend gedrag t.o.v. de blanco geïnjecteerde dieren wordt gescoord.
- Gedurende de follow-up vindt er bloedafname plaats (maximaal [REDACTED] max 8 ml /kg/2wk) en [REDACTED] plaats (bij voorkeur [REDACTED] Terminatie op vaste tijdstippen (maximaal 6*; tot maximaal 1 jaar na behandeling) waarna de organen voor ex-vivo analyse worden geïsoleerd. (biodistributie [REDACTED] in organen, histologie)

Donor dieren:

Donor dieren rat:

- Onder anesthesie implantatie van tumorweefsel (zoals bv. De R1 tumor) in de flank*. Na voldoende tumorgroei om als donor te dienen terminatie waarna tumormateriaal wordt geïsoleerd voor implantatie bij nieuwe dieren (nieuwe donor en experimentele dieren).

: indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring binnen onze groep is dat 95% van de her-implanteerde dieren alsnog een tumor ontwikkelen na een tweede implantatie.

Donor dieren konijn:

- Na preventieve pijnstilling implantatie van tumorweefsel s.c. of i.m. op de achterpoot (of eventueel flank)*,##. Na Voldoende tumorgroei om als donor te dienen terminatie waarna tumormateriaal wordt geïsoleerd voor implantatie bij nieuwe dieren (nieuwe donor en experimentele dieren).

: indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring bij de VX2 tumor is dat > 65% van de her-implantaties aanslaan.

##: Voorkeur voor implantatie s.c. echter in voorkomende gevallen slaat de tumor beter aan in de spier (betere bloedvoorziening).

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voordat de microsferen in de [REDACTED] worden getest, wordt eerst de stabiliteit uitvoerig in-vitro en ex-vivo getest. Geselecteerde formuleringen worden pas nadat gebleken is dat de compositie, grootte en stabiliteit en de [REDACTED] lekkage conform de eisen zijn op hun bio-compatibiliteit in vivo getest.

Gebruikte afkortingen:

[REDACTED]; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en [REDACTED] per microsfeer; allen onafhankelijk van elkaar getest; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms* = microsferen; *td* = toedieningsvloeistof; *ms-form.* = microsfeer formulering; [REDACTED]; [REDACTED])

Fase 2:

De groepsgrootte voor deze fase wordt bepaald volgens χ^2 variance; distance from constant; one tailed.

Hierbij wordt als uitleesparameter de verdeling van de activiteit over de tumor gebruikt. Doel is [REDACTED] van de tumor met [REDACTED] verdeeld, controle vloeistof wordt [REDACTED] verdeeld (FZ). Effect is dan [REDACTED] Met een alfa van 5%, power van 80% wordt hier een groepsgrootte van [REDACTED] **dieren per groep** verkregen.

De groepen zijn als volgt gepland:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] **groepen** per ontwikkelde microsfeer

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [REDACTED] microsfeer op [REDACTED] = 175 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal (4 * 175) = **700 ratten**.

Fase 3:

De groepsgrootte voor deze fase wordt bepaald volgens de t-test; difference between slopes; two tailed.

Hierbij wordt als parameter het verschil in tumorgroei tijd tot [REDACTED] gebruikt. Met een spreiding van [REDACTED] een alfa van 5% en een power van 80% te verkrijgen komen we uit op **[REDACTED] dieren per groep**.

De groepen zijn als volgt gepland:

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal **[REDACTED] groepen** per ontwikkelde microsfeer

[REDACTED]

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [REDACTED] microsfeer op [REDACTED] = 49 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal (4 * 49) = **196 konijnen**.

Fase 4:

De groepsgrootte voor deze fase wordt bepaald volgens de t-test; difference between slopes; two tailed.

Hierbij wordt als parameter het verschil in de negatieve effecten op de omliggende organen bepaald (Ho content; histologie). We hopen hier geen effect te vinden tussen de controles en de behandelde dieren. Een effect van [REDACTED] een alfa van 5% en een power van 90% te verkrijgen komen we uit op **[REDACTED] dieren per groep**. De gekozen power is hoger dan in fase 2 en 3 daar in deze fase de eerste onderzoeken voor veiligheid op langere termijn worden onderzocht.

De groepen zijn als volgt gepland:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal **[REDACTED] groepen** per ontwikkelde microsfeer

[REDACTED]

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [REDACTED] microsfeer op [REDACTED] = 300 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal (4 * 300) = **1200 muizen**.

Donoren:

Dit zijn dieren die dienen als tumordonor voor de experimentele dieren die in de komende jaren worden ingezet. Als er een periode is waarbij geen tumor gebruikt wordt worden er ook geen donor dieren ingezet. Binnen het [REDACTED] zijn er andere onderzoekers die hier mogelijk voor hun onderzoek gebruik van kunnen maken. Dit heeft in het verleden tot vermindering van donor dieren heeft geleid.

Voor zowel de rat als voor het konijn geldt:

- Per implantatie worden twee dieren ingezet als donor
- Tumor groei duurt 3-4 weken voor deze geoogst kan worden.
- Per jaar betekend dit 13 tot 17 maal overzetten (gem. 15)
- Totaal over 5 jaar: 5 jaar * 15 maal * 2 dieren = 150 dieren.

Totaal **maximaal 150 ratten over 5 jaar**

Totaal **maximaal 150 konijnen over 5 jaar**

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Fase 2:

Voor de ratten zijn er meerdere tumormodellen mogelijk zoals bijvoorbeeld de Nude-rat of WagRij rat met de R1-tumor (rhabdomyosaroom). Deze is al heel lang in gebruik, is erg stabiel groeit en goed doorbloed is.

Als proefdier is gekozen voor de rat omdat hiervan meerdere tumormodellen beschikbaar zijn, zoals bv. De R1 tumor in de Nude-rat of WagRij rat. Deze tumoren zijn groot genoeg voor een technisch uitvoerbare lokale injectie van een suspensie van [REDACTED] microsferen.

De dieren worden betrokken van een officiële leverancier in de EU, leeftijd van 6-8 weken. Op deze leeftijd is er voldoende "body" om de behandeling te kunnen verdagen; In verband met de [REDACTED] die wordt uitgevoerd na de behandeling met de [REDACTED] microsferen is de voorkeur voor vrouwelijke dieren. De mannelijke nude-ratten zijn al gauw te groot om met de µCT te kunnen worden gescand. Vrouwelijke dieren van ca. 11-12 weken wegen ca. 200 gram; mannelijke dieren zijn dan al 350 gram. Maximaal 4 * 175 dieren

Fase 3:

Als proefdier is gekozen voor het konijn omdat hiervan een bekend tumor model beschikbaar is. Daarbij zijn de tumoren groot genoeg om de effectiviteit van de radioactieve microsferen te onderzoeken. In deze fase ligt de nadruk op effectiviteit. Waarbij de dracht van het [REDACTED] maximaal 9 mm is. Dit aspect kan alleen in goed in een grotere tumoren van ca. 1.5 cm in doorsnede worden getest.

Hierbij wordt gebruik gemaakt van New Zealand White konijnen van een officiële leverancier in de EU; 8-10 weken; ca. 2.5-3.5 kg (*kunnen tumoren, zoals het VX2 tumor model, goed aan en ondervinden hier niet veel ongerief van*); Bij voorkeur vrouwelijke dieren. Dit i.v.m. groepshuisvesting, wat bij mannelijke dieren niet mogelijk is. Daarnaast is er bij mannelijke dieren risico op sproeien, wat met de radioactiviteit niet gewenst is i.v.m. veiligheid van medewerkers. Maximaal 4 * 49 dieren

Fase 4:

Als proefdier is gekozen voor de muis. Dit proefdier wordt ook in de standaard biocompatibiliteitstesten gebruikt wereldwijd. De hoeveelheden microsfeer suspensie en/of supernatant is aangepast aan de grootte van het proefdier. Hierbij wordt gebruik gemaakt van muizen, zoals de Balb/C van 4-6 weken. Betrokken van een officiële leverancier binnen de EU; Hierbij is de voorkeur voor vrouwelijke dieren, gezien de lange follow-up. Mannelijke dieren zijn niet in groepshuisvesting te huisvesten. Maximaal 4 * 300 dieren.

Donoren:

Rat:

Hierbij wordt gebruik gemaakt van ratten, zoals de Nude rat of de WagRij, van 6-8 weken (voldoende "body" om de behandeling te kunnen verdragen. De dieren worden betrokken van een officiële leverancier in de EU; Net als bij de experimenten wordt gekozen voor vrouwelijke dieren in verband met vergelijkbare tumorgroei. Maximaal 150 dieren.

Konijn:

Hierbij wordt gebruik gemaakt van New Zealand White konijnen van een erkende leverancier binnen de EU; 8-10 weken; ca 2.5-3.5 kg (*kunnen tumoren, zoals het VX2 tumor model, goed aan en ondervinden hier niet veel ongerief van*); Net als bij de experimenten wordt gekozen voor vrouwelijke dieren in verband met vergelijkbare tumorgroei. Maximaal 150 dieren

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☒ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Als de surplus dieren van de goede stam zijn, niet te oud zijn en naief zijn

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Ernstig ongerief is niet te verwachten, daar er al verschillende ████████-microsferen al in het dier (veterinair) of in de mens wordt toegepast. Ook hierin is ████████ en ████████ aanwezig. Voor translatie naar de mens is het wel nodig om dit in vivo te onderzoeken

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging:

Er wordt als eerste vele testen in-vitro / ex-vivo uitgevoerd om de veiligheid voor het dier zo hoog mogelijk te houden. Om de translatie naar de mens mogelijk te maken is het nodig om de microsferen in een heel organisme te testen. Hierdoor is het gebruik van dieren niet te voorkomen.

Vermindering:

Door statistische berekeningen worden er voldoende dieren per groep genomen om voldoende zekerheid te hebben van wat er uit de experimenten komt, zodat dit voldoende zou zijn om goede conclusies te kunnen trekken uit de resultaten.

Verfijning:

De dieren worden regelmatig gecontroleerd en waar nodig wordt pijnstilling toegepast of wordt het dier geëuthanaseerd als het humane eindpunt dreigt te worden bereikt. (wat niet te verwachten is).

Al het voorgestelde onderzoek zal gebruikt kunnen worden voor de registratie van deze microsferen in het zogenaamde "██████████" dat een belangrijk onderdeel zal vormen ██████████. Daarnaast zullen de biocompatibiliteit en effectiviteit een essentieel stuk vormen in de ██████████ ██████████ om de translatie naar - en toepassing bij - de patiënt mogelijk te maken.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Gevoelige/pijnlijke handelingen worden uitgevoerd onder een lichte verdoving of anesthesie; in overleg met de IvD.

Daarnaast worden de dieren goed gecontroleerd en getraind op handelen. Dit zorgt ervoor de dieren het uitvoeren van de controles niet als stress-vol ervaren.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

A: Er zou irritatie ten gevolge van de nieuw ontwikkelde [REDACTED] micorsferen kunnen ontstaan. Hiervoor worden de dieren ook regelmatig gecontroleerd op algemene welzijnskenmerken (Gedrag, houding, verzorging, uiterlijk en sociale activiteiten) om dit voor te zijn.

B: Een paar groepen zullen de leeftijd van 1 jaar overschrijden en zouden daar ongerief van kunnen ondervinden. Voor de muizen (fase 4) is dit 17% van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

A: Lekkage van bestanddelen van de microsfeer of irritatie toedieningsvloeistof.

B: ouderdom

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Uitgebreide in-vitro testen vooraf; regelmatige diercontroles gedurende het experiment

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☒ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Fase 2: rat - HEP: tumorvolume $\geq 10\%$ van het lichaamsgewicht; ulceratie van de tumor; gewichtsverlies (20% t.o.v. begin; 15% binnen 2-3 dagen); verminderde (>1 dag) of afwezige activiteit; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

Fase 3: konijn - HEP: tumorvolume $\geq 10\%$ van het lichaamsgewicht; ulceratie van de tumor; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

Fase 4: muis - HEP: gewichtsverlies (20% t.o.v. begin; 15% binnen 2-3 dagen); verminderde (>1 dag) of afwezige activiteit; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

We verwachten van de microsferen en toedieningsvloeistof zelf geen omstandigheden die humane eindpunt zouden opleveren. Zodra dit wel het geval zou zijn zal - eventueel in overleg met de dierenarts - het dier worden getermineerd.

De dieren die gedurende 12 maanden gevolgd worden worden ouder dan 1 jaar. Het is bekend dat spontane tumoren door veroudering kunnen ontstaan. Zodra dit welzijnsaantasting betekent is dit direct een reden voor euthanasie.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

$<1\%$ mbt het beschreven protocol;

27% van de dieren binnen fase 4 worden ouder dan 1 jaar en zouden daar nadeel aan kunnen ondervinden.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Fase 2:

Onder narcose/roesje tumor implantatie; tumorgroei; [REDACTED] microsfeer injectie onder narcose + scan; follow-up met regelmatige controle; doden en isolatie bloed en organen voor ex-vivo analyse. Totale ongerief zal matig zijn.

Fase 3:

Na pijnstilling tumor implantatie; tumorgroei; [REDACTED] microsfeer injectie onder narcose; scan onder narcose; follow up met scans onder narcose;

regelmatige welzijnscontrole; doden en isolatie van organen voor ex-vivo analyse. Totale ongerief zal matig zijn.

Fase 4:

injectie microsferen onder roesje; regelmatige welzijnscontrole; bloed/urine verzamelen; doden op vaste tijdstippen; isolatie organen voor ex-vivo analyse. Totale ongerief zal matig zijn.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Isolatie van relevante organen voor Ex-vivo analyse (■■■■■ content en histologie).

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.II.504.002
2. Titel van het project : Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe [REDACTED] microsfeer
formuleringen voor intratumorale injectie
3. Titel van de NTS : Ontwikkeling van [REDACTED] bolletjes voor behandeling van tumoren

4. Type aanvraag:

- ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
- ☐ wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht

Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247

Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ☒ ontvangen door DEC: 01-03-2017
- ☐ aanvraag compleet:
- ☒ in vergadering besproken: 15-03-2017
- ☐ anderszins behandeld:
- ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 20-03-2017/06-04-2017 en 10-04-2017/24-04-2017
- ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- ☐ aanpassing aanvraag:
- ☒ advies aan CCD: 26-04-2017

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 20-03-2017
- Datum antwoord: 06-04-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: U geeft aan dat het traject eerder al succesvol was. Kunt u iets van de resultaten van de klinische studie laten zien? Ook zou de DEC graag iets meer lezen over de tot nu toe behaalde resultaten intratumoraal.

De eerst ontwikkelde Holmium microsferen zijn de Holmium-PLLA-microsferen. Deze microsferen zijn door M. Smits et al [ref. 4] in een fase 1 studie (genaamd de HEPAR-1, welke een typische dosisescalatiestudie was en uitgevoerd werd in 15 patiënten) onderzocht op veiligheid bij patiënten met lever metastases. Hierbij is in een oplopende radioactiviteit dosis 166-Holmium-PLLA-microsferen (20, 40, 60 en 80 Gy) via de lever-slagader in de lever geïnjecteerd. Uit deze studie kan worden geconcludeerd dat de toediening van 166-Holmium-PLLA-microsferen veilig toegepast kon worden bij een maximale dosis van 60 Gy over de gehele lever.

De effectiviteit van de Ho-PLLA-microsferen is verder onderzocht in een fase 2 studie (genaamd HEPAR-2, effectiviteitsstudie in 38 patiënten) door J.F. Prince et al [10]. Hierbij is het effect van de 166-Holmium-PLLA-embolisatie behandeling op patiënten met lever metastasen beoordeeld. Hiervoor zijn er vooraf "target laesies" aangeduid die in de tijd m.b.v. scans worden gevolgd. Hierbij werd er bij meer dan 70% van de vooraf aangewezen "target laesies" ziektecontrole waargenomen. In deze studie werd een mediale overleving van 14 maanden gevonden, in een vergelijkbare studie met Yttrium microsferen een overleving van 8.8 maanden. De bijwerkingen waren hoofdzakelijk abdominale pijn en moeheid.

Bij de hierboven vermelde toepassing van oncologische maligniteiten worden de holmium microsferen toegediend door middel van katherisatie, om zo tumoren via de bloedbaan te bereiken. Sinds 2006 wordt er echter ook onderzoek gedaan om [REDACTED] microsferen toe te dienen in tumoren d.m.v. een intra-tumorale injectie.

Om de effectiviteit van de [REDACTED] microsferen te bepalen bij intra-tumorale toediening zijn we een studie gestart met het intra-tumoraal toedienen van [REDACTED] microsferen aan huisdieren met tumoren aan de tong. (plaveiselcelcarcinoom) De diagnose wordt vaak pas laat gesteld, waardoor complete chirurgische verwijdering niet meer mogelijk is. In een studie verband hebben we deze dieren behandeld met een – in een oplopende dosis radioactiviteit - intra-tumorale injecties met [REDACTED] microsferen. De behandeling kon succesvol worden toegepast bij deze veterinaire patiënten. Hierbij werd bij 27% compleet respons gezien, 36% partiële respons, en 18% stabiele ziekte. In deze studie was een duidelijke relatie tussen de toegediende dosis [REDACTED] microsferen en de uitkomst. In eerdere studies met external beam bestraling van deze groep dieren werden er meer complicaties gezien ten opzichte van deze studie.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Het is de DEC niet helder waarom in fase 2, 3 en 4 zoveel verschillende vormen van microsferen (zowel [REDACTED]) gebruikt worden. En wat is de toegevoegde waarde van het gebruik van de zowel koude als afgekoelde microsferen; waarom werkt u niet alleen met afgekoelde materialen? Dat scheelt behoorlijk in het aantal dieren. Graag verhelderen.

Er wordt voor de fase 2 en fase 4 gebruik gemaakt van [REDACTED] microsferen en [REDACTED] of [REDACTED] microsferen. Bij toediening van [REDACTED] microsferen wordt naar de effecten van de microsferen voor [REDACTED] gekeken. De [REDACTED] microsferen worden ook als controle meegenomen. Hierbij zijn de effecten die worden gevonden tegen gevolge van de mogelijke chemische reactie van de microsferen met het lichaam/tumor zoals ze geproduceerd worden. Na [REDACTED] activatie ([REDACTED]) wordt gekeken naar de eventuele effecten hier bovenop ten gevolge van deze [REDACTED] activatie. Het zou mogelijk kunnen zijn dat de microsferen hierdoor [REDACTED] en dus een ander [REDACTED] activatie.

We gebruiken therapeutische ([REDACTED] microsferen, om met name het effect van de activiteit te onderzoeken. In sommige gevallen is echter het effect (bijvoorbeeld bij acute experimenten) minder belangrijk, en is vooral de distributie van de microsferen belangrijk welke zich o.a. goed laat meten met [REDACTED] microsferen. Ook vanuit wettelijk aspect moet er gewerkt worden met zo laag mogelijke activiteit waar dat mogelijk is.

Voor fase 3 worden de dieren behandeld met controle – [REDACTED] - microsferen en [REDACTED] verschillende dosissen radioactieve microsferen. Totaal dus [REDACTED] microsferen om de effectiviteit te testen van de behandeling op de tumorgroei. Hierin zijn de [REDACTED] microsferen de controle en wordt er een dosisafhankelijkheid getest gelieerd aan de effectiviteit.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: In de bijlage wordt niet genoemd dat er in fase 4 ook naar gedrag wordt gekeken, wat wel genoemd staat in de strategie van het projectvoorstel. Graag verhelderen/wijzigen.
Dit is inderdaad een onderdeel van de te scoren parameters, dit is in de bijlage aangepast
Toegevoegd: *Regelmatische controle op welzijn en gedrag gedurende de follow-up. Afwijkend gedrag t.o.v. de blanco geïnjecteerde dieren wordt gescoord.*
- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC vraagt zich af of de organen ook histopathologisch beoordeeld worden?
Dit is zeker een goede optie. De organen worden na terminatie geïsoleerd en eventueel direct voor histologie gebruikt of opgeslagen in de -80°C vriezer, voor de [REDACTED] als ook voor andere analyses uit te voeren. Histologie van de weefsels zal onderdeel zijn van het onderzoek en is als zodanig toegevoegd aan het protocol.
- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC gaat ervan uit dat u niet meer dan twee keer een tumorinoculatie doet. Klopt dat?
De implantatie wordt normaal eenmalig uitgevoerd. Als dit – om wat voor rede dan ook - niet aanslaat wordt deze handeling eenmalig herhaald. Mochten er duidelijke redenen zijn dat maakt dat er geen tumor is aangeslagen in een specifiek dier zou dit in overleg met - en met toestemming van - de IvD besloten kunnen worden om dit een derde maal te proberen.
- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Volgens de DEC dient het aantal dieren bij fase 4 4 x 175 in plaats van 4 x 196 te zijn. Graag wijzigen.

Hier kan ik u helaas niet helemaal volgen; Hieronder de dieraantallen nogmaals verder uitgeschreven:

Voor fase vier: (muis)

Deze fase bestaat uit de volgende [redacted] per microsfeer:

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]

Er zijn [redacted] met [redacted] per groep → geeft 300 dieren per microsfeer. Totaal voor 4 ontwikkelde microsferen zou dit maximaal $4 * 300 = 1200$ dieren betekenen.

Voor Fase 3: (konijn)

Deze fase bestaat uit de volgende 7 groepen per microsfeer:

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]

Hierbij wordt de effectiviteit op de tumorgroei bepaald. Totaal dus [redacted], [redacted] [redacted]. Totaal voor 4 ontwikkelde microsfeer zou dit maximaal $4 * 49 = 196$ dieren betekenen.

Voor Fase 2: (rat)

Deze fase bestaat uit de volgende [redacted] per microsfeer:

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted] zout

Hierbij zijn er [redacted] [redacted] ontwikkelde microsfeer. Totaal voor 4 ontwikkelde microsfeer zou dit maximaal $4 * 175 = 700$ dieren betekenen.

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, beschrijving beoogde behandeling van de dieren en onderbouwing gekozen aanpak: Hier wordt bij fase 4 gesproken over een deel a, wat de suggestie geeft dat er dan ook een deel b is, maar dat staat niet genoemd. Vervolgens wordt bij I (overige aantasting van het welzijn en maatregelen) gesproken over fase 4-1 en fase 4-2. Wordt hiermee deel a en deel b bedoeld? Zo ja, dan mist deel b bij de beschrijving van de beoogde behandeling en zou het helderder zijn als bij I dezelfde benaming wordt gebruikt.

Dit is inderdaad het geval, excuus voor de verwarring. Het was in de eerste opzet de bedoeling, maar na intern overleg is hiervan afgezien. Fase 4 bestaat uit een deel. De overige vermeldingen voor fase a / b (1 / 2) zijn verwijderd.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 10-04-2017
- Datum antwoord: 24-04-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:
 - M.b.t. de vraag over het gebruik van [REDACTED] geeft u aan dat 'de microsferen hierdoor [REDACTED] en dus een ander bio-compatibiliteit hebben dan zonder deze [REDACTED]'. Dat is juist de reden dat de DEC het nut van het gebruik van [REDACTED] microsferen betwijfelt. [REDACTED] microsferen zullen niet in patiënten toegepast worden, dus waarom zouden eigenschappen en effecten van deze microsferen in kaart gebracht moeten worden? Graag nader uitleggen/motiveren.
De gedachte achter het gebruik van de [REDACTED] microsferen om deze te gebruiken als controle: We willen de [REDACTED] microsferen meenemen om aan te tonen (evt. uit te sluiten) dat de microsferen na [REDACTED] stabiel zijn en gelijk reageren als de [REDACTED] microsferen. (= Controle groep). Immers de microsferen ondergaan door de [REDACTED] [REDACTED] grote veranderingen in [REDACTED]. Om te onderzoeken of deze [REDACTED] heeft moeten we deze vergelijken met de juiste controle, namelijk [REDACTED] microsferen.
 - M.b.t. de aantallen: heeft de DEC niet helemaal de juiste vraag gesteld, waarvoor excuses. De vraag van de DEC had niet betrekking op bijlage 4, maar op bijlage 2. In de bijlage dierproeven onder B (op p. 8 van 13) staat dat maximaal 4 x 196 dieren nodig zijn, maar hier moet staan 4 x 175.
Deze inconsistentie is aangepast.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:

- Datum expert advies:
- Advies expert:

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. De aanvraag heeft een concreet doel, dat is opgesplitst in een viertal fases (fase 1 valt niet onder de wod), en kan getypeerd worden als een project. De aanvrager heeft duidelijk beschreven dat de uitkomst van fase 2 van belang is voor fase 3 en de uitkomst van fase 3 voor fase 4 en dat de opzet derhalve sequentieel is. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Handreiking Invulling Definitie Project'. Het is helder welke handelingen de individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondervinden. De DEC is er om die reden van overtuigd dat de het project toetsbaar is.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is om de stabiliteit, biocompatibiliteit, toxiciteit en effectiviteit van formuleringen met ██████████ in-vivo te bepalen. Het uiteindelijke doel van het project is het om nieuwe ██████████ microsfeer formuleringen, met een ██████████ concentratie, intratumoraal toe te dienen. Omdat tumoren niet altijd operatief verwijderd kunnen worden en radiotherapie en systemische behandelingen soms beperkt beschikbaar zijn of maar een beperkt effect hebben, zijn door de onderzoeksgroep radioactieve ██████████ ontwikkeld welke worden toegediend middels katherisatie, om zo tumoren via de bloedbaan te bereiken. Sinds ██████████ worden deze ██████████-bolletjes ook intra-tumoraal geïnjecteerd. Om deze behandelingstechniek effectiever te maken wil men microsferen ontwikkelen met een ██████████ concentratie. Voordeel hiervan is dat een hogere dosis kan worden toegediend terwijl het volume suspensie niet groter wordt. Voordat een hogere ██████████ concentratie toegepast kan worden dient de veiligheid en het precieze behandelingseffect in kaart te worden gebracht. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de (toekomstige) patiënt.
- De eerste belanghebbenden zijn (toekomstige) kankerpatiënten. Door het bepalen van de veiligheid en het behandelingseffect van [REDACTED] microsferen kan op termijn een betere therapie voor de behandeling van tumoren worden toegepast. De morele waarden die derhalve worden bevorderd zijn: welzijn en rechtvaardigheid. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ervaren. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden. Voor het onderzoeksveld geldt dat dit project kan bijdragen aan een goede wetenschappelijke reputatie en kan leiden tot nieuwe wetenschappelijke inzichten. Wetenschappelijke reputatie kan door het onderzoeksveld van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De onderzoeksgroep houdt zich al sinds 1994 bezig met de ontwikkeling van radioactieve holmium-bolletjes en humane toepassing daarvan. Om die reden is de DEC ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Het projectvoorstel bestaat uit één bijlage, welke is opgedeeld in 4 fases van onderzoek. Fase 1 behelst het in-vitro ontwikkelen en testen van nieuwe microsferen en toedieningsvloeistoffen met celkweken en slachtafval en valt derhalve niet onder de reikwijdte van de Wet op de dierproeven. Het feitelijke dierexperimenteel onderzoek start bij fase 2, waarin de microsfeer distributie in tumoren bij intra-tumorale toediening wordt getest in ratten. Als blijkt dat de microsferen een goede verdeling over de tumor laten zien, worden de nieuwe microsferen verder meegenomen voor bepaling van de optimale dosis en effectiviteit op de tumor in fase 3. Hiervoor worden konijnen gebruikt. Wanneer de microsferen bewezen effectief zijn, en dus een vertraging van de tumorgroei laten zien, wordt er in fase 4 in muizen naar de biocompatibiliteit van deze nieuwe microsferen gekeken. De verschillende fases gelden als go/no-go moment. Naast de verschillende fases van onderzoek wordt in bijlage 1 ook het gebruik van het in vivo in kweek houden van de tumormodellen met behulp van donordieren beschreven. Deze donordieren worden ingezet in fase 2 en 3. De DEC is van mening dat het project goed doordacht is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en

helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat verwacht mag worden dat de doelstellingen van het project behaald zullen worden.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

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

Surplus dieren kunnen gebruikt worden indien ze beschikbaar, van de juiste stam, niet te oud en naïef zijn.

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het ongerief is voor alle dieren ingeschat als matig. De dieren in fase 2 en 3 worden diverse malen onder narcose gebracht voor het implanteren van de tumor, de intra-tumorale injectie en de imaging. In fase 4 krijgen de dieren tijdens een roesje de microsferen i.p. toegediend en wordt maximaal 5 keer bloed afgenomen en urine bemonsterd. De donordieren krijgen onder anesthesie (rat) of middels een s.c. of i.m. injectie (konijn) tumorweefsel geïmplanterd. Na afloop van de experimenten worden de dieren gedood. Gezien deze handelingen is de DEC van mening dat het genoemde ongerief een realistische inschatting is.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast als gevolg van geïnduceerde tumorgroei en verschillende experimentele handelingen, zoals chirurgie, intra-tumorale injecties, imaging en bloedafnamen.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De aanvrager heeft, per fase duidelijk weergegeven wat de humane eindpunten zijn. Het maximale tumorvolume is vastgesteld op 10% van het lichaamsgewicht (fase 2 en 3). Van de microsferen en de toedieningsvloeistof wordt geen ongerief verwacht dat tot een humaan eindpunt zou kunnen leiden. De dieren die in fase 4 12 maanden lang gevolgd worden kunnen mogelijk spontane tumoren krijgen door ouderdom. De verwachting is dat 27% van deze dieren om die

reden het humane eindpunt bereikt. Van de overige dieren in het projectvoorstel wordt verwacht dat <1% het humane eindpunt bereikt.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voordat gestart wordt met de dierproeven worden in fase 1 de nieuwe microsferen en toedieningsvloeistoffen in vitro ontwikkeld en getest met celkweken en slachtafval. Op die manier wordt voorkomen dat er speciaal voor dit deel van het onderzoek dieren gedood moeten worden. Om een volledig beeld te krijgen van de stabiliteit, biocompatibiliteit, toxiciteit en effectiviteit van formuleringen met [REDACTED] zijn echter levende dieren nodig. Dit is ook noodzakelijk voor de registratie van de microsferen in het zogenaamde "[REDACTED]" dat een belangrijk onderdeel zal vormen van een [REDACTED]. Daarnaast zullen de biocompatibiliteit en effectiviteit een essentieel onderdeel vormen in de [REDACTED] - en toepassing bij - de patiënt mogelijk te maken.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Voor de berekening van het aantal benodigde dieren zijn statistische methoden toegepast. Onnodig proefdiergebruik wordt voorkomen met behulp van heldere go/no-go momenten.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De experimentele handelingen vinden plaats onder verdoving en er worden adequate humane eindpunten toegepast. De tumoren worden zo klein mogelijk gehouden. De dieren worden hiertoe nauwlettend geobserveerd, zodat tijdig geconstateerd wordt wanneer een dier het humaan eindpunt bereikt, en ernstig ongerief voorkomen wordt. Voor iedere fase worden verschillende proefdieren gebruikt. In fase 2 is gekozen voor de rat omdat de onderzoeksgroep reeds ervaring heeft met de hiervoor beschikbare tumormodellen. Daarnaast zijn de tumoren in de rat groot genoeg voor een technisch uitvoerbare lokale injectie met een suspensie van [REDACTED] microsferen. In fase 3 wordt gewerkt met konijnen omdat hiervan een bekend tumormodel beschikbaar is. Omdat in deze fase de nadruk ligt op de effectiviteit van de radioactieve microsferen en de dracht van [REDACTED] is, kan dit aspect alleen goed in grotere tumoren van [REDACTED] cm in doorsnede worden getest. In de laatste fase is gekozen voor de muis omdat dit het wereldwijde standaardmodel voor biocompatibiliteitstesten is. Voor de donordieren worden – logischerwijs - ratten (fase 2) en konijnen (fase 3) gebruikt.
17. Voor zover bij de DEC bekend, is er geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Er zullen in de bijlage, bij voorkeur, alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden. Omdat mannelijke nude-ratten al gauw te groot zijn om in de μ CT te kunnen worden gescand, gaat de voorkeur in fase 2 uit naar vrouwelijke dieren van ca. 11-12 weken en ca. 200 gram. In fase 3 gaat de voorkeur uit naar vrouwelijke konijnen omdat groepshuisvesting bij mannelijke konijnen niet mogelijk is. Daarnaast bestaat er bij mannelijke konijnen het risico op sproeien, wat met de radioactiviteit niet gewenst is i.v.m. de veiligheid van medewerkers. In fase 4 gaat de voorkeur eveneens uit naar vrouwelijke dieren (muizen), gezien de lange follow-up. Mannelijke dieren zijn niet in groepshuisvesting te huisvesten. Voor de donordieren (zowel rat als konijn) wordt net als bij de experimenten gekozen voor vrouwelijke dieren in verband met vergelijkbare tumorgroei. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat het voor het behalen van de doelstelling noodzakelijk is relevante organen te isoleren voor histologie, ex vivo analyse en voor het bepalen van de biodistributie van [REDACTED]. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel muizen, ratten en konijnen worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het in kaart brengen van de stabiliteit, biocompatibiliteit, toxiciteit en effectiviteit van formuleringen met [REDACTED], de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief. Daar staat tegenover dat er met dit onderzoek belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten kunnen worden verworven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Kanker is helaas nog steeds een veel voorkomende aandoening waarvoor niet altijd goede behandelmogelijkheden zijn, met als gevolg dat een groot aantal patiënten komen te overlijden. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project inzicht geven in de veiligheid en het behandel-effect, wat – bij een positieve uitslag – ertoe kan leiden dat

tumoren voortaan lokaal en met een [REDACTED] behandeld kunnen worden. Dit is een groot voordeel voor de patiënt aangezien verwacht wordt dat de hogere activiteit en intra-tumorale toediening zorgen voor een betere tumorbehandeling [REDACTED] vanwege het kleinere benodigde volume dat hoeft te worden toegediend in de tumor. De DEC kent daar ook veel gewicht aan toe.

Het is aannemelijk dat de fundamenteel-translatie doelstelling behaald zal worden.

Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het bepalen van de stabiliteit, biocompatibiliteit, toxiciteit en effectiviteit van formuleringen met [REDACTED] een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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
AVD1150020171632

Bijlagen

2

Datum 2 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 mei 2017. Het gaat om uw project "Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020171632. 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:

2 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020171632

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
2 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020171632

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 30244197
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 
Functie: 
Afdeling: 
Telefoonnummer: 
E-mailadres: 

Datum:
2 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020171632

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? ☒ [x] 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 juli 2017
Geplande einddatum: 1 juli 2022
Titel project: Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van holmium bolletjes voor behandeling van tumoren
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
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:

Utrecht

Datum:

26 april 2017

Datum:

2 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020171632



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


**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
AVD1150020171632
Bijlagen
2

Datum 2 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 mei 2017
Vervaldatum: 1 juni 2017
Factuurnummer: 171632
Ordernummer: o.v.v. CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020171632	€ 1035,00

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.

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 31 mei 2017 15:25
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: vragen bij de behandeling van AVD1150020171632

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED],

Hierbij onze reactie op de onderstaande vragen, Hoop dat het een beetje duidelijker wordt,

Met vriendelijke groet

[REDACTED]
[REDACTED]

- Waarom is het nodig om dit onderzoek in 3 verschillende diersoorten uit te voeren?

Voor fase 2:

Als proefdier is hier gekozen voor de rat.

- Noodzakelijkheid tumor-model welke beschikbaar is in muizen, ratten en konijnen.

- Tumor relatief groot omdat we de verdeling van de microsferen willen beoordelen in de tumor. Deeltjes worden intra-tumoraal geïnjecteerd. Waarbij belangrijk is om de dracht van de straling in het achterhoofd te houden. De behandeling die we hier uiteindelijk mee willen doen – het gaat om radioactieve [REDACTED] met een maximale dracht van [REDACTED] in weefsel maar waar in de eerste [REDACTED] de meeste energie al wordt afgegeven. Dit betekent dat de tumor ca. [REDACTED] in diameter moet zijn waarover de deeltjes zich moeten verdelen. Bij een te kleine tumor zal de straling de volledige tumor maar ook daar buiten bestralen. We leren daardoor niets over de verdeling en injectietechniek. Hierdoor vallen muizen voor deze fase af.

- Voor de beeldvorming willen we gebruik maken van de [REDACTED]. Deze is geschikt voor muizen en ratten (niet al te grote ratten). Het is niet mogelijk om hierin een konijn te kunnen scannen, waardoor ook het konijn in deze fase afvalt. Dit maakt dat we uitgekomen zijn op het proefdier rat.

Voor fase 3:

- Noodzakelijkheid tumor-model welke beschikbaar is in muizen, ratten en konijnen.

- Tumor relatief groot omdat we de verdeling van de microsferen willen beoordelen in de tumor. Deeltjes worden intra-tumoraal geïnjecteerd. Waarbij belangrijk is om de dracht van de straling in het achterhoofd te houden. De behandeling die we hier uiteindelijk mee willen doen – het gaat om radioactieve [REDACTED] met een maximale dracht van [REDACTED] in weefsel maar waar in de eerste [REDACTED] de meeste energie al wordt afgegeven. Dit betekent dat de tumor [REDACTED] in diameter moet zijn waarover de deeltjes zich moeten verdelen. Bij een te kleine tumor zal de straling de volledige tumor maar ook daar buiten bestralen. We leren daardoor niets over de verdeling en injectietechniek. Hierdoor vallen muizen voor deze fase af.

- In deze fase ligt de nadruk op de effectiviteit van de behandeling. Het dier moet na de intra-tumorale injectie met (wel/niet radioactieve) microsferen een redelijke follow-up kunnen hebben om de effectiviteit te kunnen bepalen van de behandeling die is gegeven. De tumor moet na de behandeling nog door kunnen groeien. Dit is bij de muis of rat niet of slechts beperkt mogelijk door het beperkte formaat van de dieren. Deze vallen hierdoor af in deze fase. Bij de konijn is hier meer ruimte voor. Dit maakt dat we zijn uitgekomen op het proefdier konijn.

Voor fase 4:

Als proefdier is gekozen voor de muis. Dit proefdier wordt ook in de standaard biocompatibiliteitstesten gebruikt wereldwijd. Hierbij spelen tumoren geen rol en is het praktischer om deze experimenten – in de voorbereiding tot implementatie naar de patiënt toe – uit te voeren in muizen.

Is het mogelijk om de biocompatibiliteit en effectiviteitsstudies te combineren?

Zoals uit het bovenstaande naar voren komt is het niet mogelijk om de biocompatibiliteit en de effectiviteitsstudie te combineren. De effectiviteitsstudie wordt uitgevoerd in het konijn. Voor de biocompatibiliteitsstudie wordt wereldwijd gebruik gemaakt van het proefdier muis. Om deze studie een voorbereiding te laten zijn op latere implementatie naar de patiënt is het praktischer om deze ook uit te voeren in muizen. Natuurlijk geven de konijnen in fase 3 – de effectiviteit studie – al wel beperkte informatie over de biocompatibiliteit.

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]

Verzonden: dinsdag 23 mei 2017 14:00

Aan: [REDACTED]

Onderwerp: RE: vragen bij de behandeling van AVD1150020171632

Beste [REDACTED],

Zoals zojuist telefonisch besproken zou de CCD graag nog wat extra informatie over de volgende vragen ontvangen:

- Waarom is het nodig om dit onderzoek in 3 verschillende diersoorten uit te voeren?
- Is het mogelijk om de biocompatibiliteit en effectiviteitsstudies te combineren?

We hebben afgesproken dat de antwoorden in de volgende CCD vergadering van 2 juni worden besproken,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

Namens Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Van: [REDACTED]

Verzonden: woensdag 10 mei 2017 23:14

Aan: info@zbo-ccd.nl; info@ivd-utrecht.nl; [REDACTED]

Onderwerp: Re: vragen bij de behandeling van AVD1150020171632

Beste [REDACTED]

Bedankt voor uw opmerkingen naar aanleiding van onze CCD aanvraag AVD1150020171632
Hierbij onze toelichtingen op uw vragen:

Vraag 1:

In de bijlage dierproeven onder C. zowel JA als NEE aangekruist bij hergebruik. U heeft als toevoeging geschreven dat u surplus dieren kunt overwegen voor hergebruik. Naïeve surplus dieren zijn waarschijnlijk niet eerder gebruikt in dierproeven, dit zou dan geen hergebruik zijn. Betreft het hergebruik/ inzetten van surplus dieren alleen de donordieren of ook de experimentele dieren? Kunt u dit duidelijker beschrijven in de bijlage dierproeven?

Er zijn in onze instelling in eerdere onderzoeken naïeve dieren beschikbaar gekomen, deze hebben we in eerdere experimenten dan ook gebruikt voor onze experimenten. Wij waren in de veronderstelling dat dit 'hergebruik' dieren waren. Echter dit blijken 'surplus dieren' te zijn. Deze zijn zeker bruikbaar voor zowel de donor dieren als voor de experiment dieren.

Hergebruik dieren waarbij eerder toedieningen van farmaca zijn gedaan zijn voor deze experimenten of donoren niet toepasbaar omdat we de tumorgroei niet hiermee willen beïnvloeden. Als er dieren vrij komen uit gedrachts-onderzoek (zonder toediening van farmaca) van goede soort/stam/leeftijd met goede conditie en dan kunnen deze dieren als donor of ook als experiment dier worden ingezet.

In de aanvraag - onder C - als volgt gewijzigd:

Als er surplus dieren van de goede soort/stam/leeftijd beschikbaar zijn kunnen de deze dieren in deze studie gebruikt worden. Hergebruik dieren van bv gedragsonderzoek - afhankelijk van voorgaande handelingen en conditie - waarbij er geen farmaca zijn toegediend kunnen als donor of als experiment dier worden ingezet.

Vraag 2:

Bij de ongerief classificatie geeft u aan dat de dieren cumulatief matig ongerief ondervinden. Dit lijkt vooral om de experimentele dieren te gaan omdat deze meerdere experimentele handelingen ondergaan. Uit de beschrijving maken wij op dat de donordieren veel minder experimentele handelingen ondergaan en mogelijk slechts licht ongerief ondervinden. Kunt u dit toelichten en wanneer van toepassing de donordieren apart opnemen in de beschrijving van de ongerief classificatie? Als dit wijzigt dan zal ook de Niet technische Samenvatting aangepast moeten worden.

U heeft inderdaad een goed punt dat de donor dieren veel minder handelingen ondergaan dan de experimentele dieren. Onder de oude wet zouden deze volgens onze inschatting onder "gering/matig ongerief" ingedeeld worden. Echter onder de nieuwe wet is de keuze "licht ongerief" of "matig ongerief".

In nieuw overleg met de instantie voor dierenwelzijn zijn we tot de inschatting "matig ongerief" gekomen, ondanks dat de dieren minder handelingen als de experimentele dieren ondergaan.

Het ongerief van de donoren hadden we niet apart vermeld bij de ongerief inschatting, excuus voor deze verwarring. We hebben dit in de bijgevoegde documenten aangepast.

Toegevoegd - onder K:

Bij de donoren wordt er een tumor geïmplant (bij de rat na een roosje) waarna er tumor groei plaats vindt. Totale ongerief zal matig zijn.

Vraag 3:

Voor onze informatie; u beschrijft dat u proeven uitvoert ten behoeve van biocompatibiliteit en toxiciteit, wordt niet vaak voorgeschreven om dit type studies in beide geslachten uit te voeren? Kunt u dit toelichten?

Als we de vraag goed interpreteren in relatie met ons project is de vraag waarom we niet voor beide geslachten kiezen i.p.v. alleen vrouwelijke dieren.

In deze fase van het onderzoek met langdurige follow-up worden experimenten met slechts een geslacht geaccepteerd (in dit geval vrouwelijke dieren). Al het voorgestelde onderzoek zal gebruik kunnen worden voor de registratie van deze microsferen in het zogenaamde "██████████" dat een belangrijk onderdeel zal vormen van een ██████████. Daarna zullen deze biocompatibiliteit en toxiciteit experimenten een onderdeel vormen van ██████████ ██████████ om de translatie naar - en toepassing bij - de patiënt mogelijk te maken. Dit traject heeft de holmium research groep al eerder doorgemaakt.

Rede waarom we in deze fase met alleen vrouwelijke dieren werken is de lange follow-up duur (tot een jaar) die in deze experimenten staan beschreven. Voor deze studie willen we de dieren onder optimale omstandigheden huisvesten, dit is in groepshuisvesting. Vanwege het risico op vachten is het niet mogelijk om mannelijke dieren zo lang in groepshuisvesting te houden. Met het oog op dieren welzijn hebben we gekozen om de dierenwelzijn in deze fase te laten overheersen en uit te voeren met vrouwelijke dieren.

We hopen de de reactie op uw vragen duidelijk zijn,

Met vriendelijke groet,

██████████
██████████

Van: ██████████
Verzonden: donderdag 4 mei 2017 15:02
Aan: ██████████
Onderwerp: Fwd: vragen bij de behandeling van AVD1150020171632

Verstuurd vanaf mijn iPhone

Begin doorgestuurd bericht:

Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Datum: 4 mei 2017 14:54:08 CEST
Aan: ██████████
Kopie: 'Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht' <info@ivd-utrecht.nl>
Onderwerp: vragen bij de behandeling van AVD1150020171632

Geachte ██████████

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend, bij de behandeling hiervan hebben wij een aantal vragen. Het betreft uw project: Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe ██████████ microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie, met nummer AVD1150020171632. In de bijlage dierproeven onder C. zowel JA als NEE aangekruist bij hergebruik. U heeft als toevoeging geschreven dat u surplus dieren kunt overwegen voor hergebruik. Naïeve surplus dieren zijn waarschijnlijk niet eerder gebruikt in dierproeven, dit zou dan geen hergebruik zijn. Betreft het hergebruik/ inzetten van surplus dieren alleen de donordieren of ook de experimentele dieren? Kunt u dit duidelijker beschrijven in de bijlage dierproeven?

Bij de ongeriefclassificatie geeft u aan dat de dieren cumulatief matig ongerief ondervinden. Dit lijkt vooral om de experimentele dieren te gaan omdat deze meerdere experimentele handelingen ondergaan. Uit de beschrijving maken wij op dat de donordieren veel minder experimentele handelingen ondergaan en mogelijk slechts licht ongerief ondervinden. Kunt u dit toelichten en wanneer van toepassing de donordieren apart opnemen in de beschrijving van de ongeriefclassificatie? Als dit wijzigt dan zal ook de Niet technische Samenvatting aangepast moeten worden.

Voor onze informatie; u beschrijft dat u proeven uitvoert ten behoeve van biocompatibility en toxiciteit, wordt niet vaak voorgeschreven om dit type studies in beide geslachten uit te voeren? Kunt u dit toelichten?

Uw aanvraag zal op 12 mei door de CCD besproken worden,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zijn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren. Het Universitair Medisch Centrum Utrecht is een publiekrechtelijke rechtspersoon in de zin van de W.H.W. (Wet Hoger Onderwijs en Wetenschappelijk Onderzoek) en staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel voor Midden-Nederland onder nr. 30244197.

Denk s.v.p aan het milieu voor u deze e-mail afdrukt.

This message may contain confidential information and is intended exclusively for the addressee. If you receive this message unintentionally, please do not use the contents but notify the sender immediately by return e-mail. University Medical Center Utrecht is a legal person by public law and is registered at the Chamber of Commerce for Midden-Nederland under no. 30244197.

Please consider the environment before printing this e-mail.



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>01</td><td>Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe XXXXXXXXXX microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening.</td></tr></table>	Volgnummer	Type dierproef	01	Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe XXXXXXXXXX microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening.
Volgnummer	Type dierproef					
01	Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe XXXXXXXXXX microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening.					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Alvorens de nieuw ontwikkelde XXXXXXXXXX microsferen getransleerd kunnen worden naar de mens zijn enkele dierproeven noodzakelijk. De verschillende microsferen – als formulering in een toedieningsvloeistof - zullen eerst gekarakteriseerd worden volgens de volgende strategie:

Fase 1: in-vitro ontwikkeling en testen van nieuwe [REDACTED] microsferen (al een lopend proces)

De vier meest optimale microsferen met de daarbij behorende twee meest optimale toedieningsvloeistoffen per microsfeer worden verder mee genomen naar de in-vivo studie. Totaal [REDACTED].

Fase 2: microsfeer distributie over de tumor (**rat**)

- Na tumor implantatie (s.c.) en groei hiervan wordt er intra tumoraal [REDACTED] microsferen toegediend. Na de injectie wordt er een [REDACTED] gemaakt om de verdeling en eventuele 'doorschieten' te detecteren. Op een tijdsreeks wordt het dier opgeofferd en worden de tumoren en organen geïsoleerd om ex-vivo verder te analyseren of eerder als het HEP wordt bereikt.

Groepsindeling voor iedere microsfeer:

Maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee test toedieningsvloeistoffen per microsfeer; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; [REDACTED]*)

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] groepen per ontwikkelde microsfeer
([REDACTED])

Fase 3: effectiviteit van de microsfeer behandeling op de tumorgroei (**konijn**)

- Na tumor implantatie en tumor groei wordt er intra-tumoraal een oplopende dosis radioactiviteit toegediend om het effect op de tumor te bepalen. Na de toediening vindt er beeldvorming plaats om de [REDACTED] distributie te bekijken en te controleren of er geen eventuele lekkage van de activiteit heeft plaats gevonden. Dit kan direct of enkele dagen erna. Gedurende de follow-up wordt de tumorgroei gevolgd en worden er nog meer scans gemaakt om het verloop van de verdeling in beeld te krijgen (Beeldvorming [REDACTED] zichtbaar is). Als de tumor [REDACTED] het begin volume heeft bereikt of het HEP bereikt is wordt het dier getermineerd. Isolatie van tumor en organen voor ex-vivo analyse.

Maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee test toedieningsvloeistoffen per microsfeer; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; [REDACTED]*)

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- z [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- Totaal maximaal ■ groepen per ontwikkelde microsfeer

[redacted]

Fase 4: Testen biocompatibiliteit in-vivo (**muis**)

Bepalen release van [redacted] in een tijdreeks na i.p. toedienen van microsfeer formuleringen, zowel [redacted] microsferen als ([redacted]) [redacted] microsferen. Daarnaast wordt het supernatant van de formuleringen mee genomen. Als formulering wordt gezien de microsfeer (ms) + toedieningsvloeistof (td). Als controle wordt [redacted] mee genomen.

Groepsindeling: Voor microsfeer A (maximaal 4 soorten microsferen; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en twee toedieningsvloeistoffen per microsfeer; allen onafhankelijk van elkaar getest; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms = microsferen; td = toedieningsvloeistof; ms-form. = microsfeer formulering; [redacted]*))

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- Totaal maximaal ■ groepen per ontwikkelde microsfeer

[redacted]

Tot maximaal ■ maal per week wordt er bloed afgenomen (houdend aan de maximale toegestane hoeveelheid (8 ml/kg / 2 wk.)). Ook [redacted] [redacted] worden gecontroleerd op [redacted] content als algemene parameter [redacted] in vivo. Op vaste tijdstippen worden de dieren getermineerd – of eerder als het HEP wordt bereikt – en worden de relevante organen geïsoleerd en de biodistributie van [redacted] wordt hierin bepaald.

Donor dieren (rat en konijn)

Voor het in vivo in kweek houden van de tumormodellen (zoals VX2 in het Konijn, zoals de R1 in de rat) voor onderdelen uit dit project zijn we genoodzaakt gebruik te maken van donordieren. Dat er voor deze tumorcellen donordieren nodig zijn is omdat de tumoren niet direct uit cellen te gebruiken zijn. De opbouw van de tumor is dan nog niet stabiel en varieert qua groei, vorm en necrotische haard. Pas na opkweek in een (tot twee) passages in het dier krijg je een stabiele goed gevasculariseerde tumor die transplanteerbaar is. Binnen het [REDACTED] zijn er mogelijk andere onderzoekers die hier voor hun onderzoek gebruik van kunnen maken. Dit heeft in het verleden tot vermindering van donor dieren heeft geleid.

De VX2 tumor voor in het konijn is een tumor die al beschreven is in 1935 en wordt gebruikt als tumormodel in de lever, hoofd/hals, pancreas baarmoeder, longen etc.. De tumor groeit stabiel, is goed gevasculariseerd en is een alom gebruikt tumor model in het konijn, ook in de beeldvormende onderzoekslijnen. Met deze tumorlijn is veel ervaring binnen de groep.

Voor de ratten zijn er meerdere tumormodellen mogelijk zoals bijvoorbeeld de Nude-rat of WagRij rat met de R1-tumor (rhabdomyosarcom). Deze is al heel lang in gebruik, groeit erg stabiel en is goed doorbloed.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Fase 2: microsfeer distributie over de tumor (**rat; tumor**)

- Onder anesthesie implantatie van tumorweefsel (zoals bv. De R1 tumor) in de flank[#]. Na tumor groei onder injectie anesthesie intra-tumorale injectie met [REDACTED] microsferen of [REDACTED] vloeistof gevolgd door een scan (extern). Gedurende de follow up - op indicatie – een extra scan (extern) onder injectie anesthesie. Op een reeks van tijdstippen anesthesie, bloedafname en terminatie^{##}. Isolatie van organen en tumoren voor [REDACTED] content en verdeling en histologie. (maximaal [REDACTED] tijdstippen; maximaal tot 21 dagen)

[#] : indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten.

Ervaring bij de R1 tumor is dat 95% van de her-implantaties aanslaan.

^{##}: of eerder als het dier het Humane Eind Punt (HEP) dreigt te halen

Fase 3: Effectiviteit [REDACTED] microsfeer behandeling en microsfeer distributie over de tumor. (**konijn; tumor**)

- Na preventieve pijnstilling implantatie van tumorweefsel s.c. of i.m. op de achterpoot (of eventueel flank)[#]. Na voldoende tumorgroei transport naar extern, toedienen anesthesie en intra-tumorale injectie met oplopende dosis radioactieve microsferen gevolgd door scan (CT, MRI of echo).

Gedurende de follow-up worden er bloedafnames gedaan (maximaal [REDACTED] en extra scans onder anesthesie (extern; maximaal [REDACTED] Terminatie als de tumor 4* het begin volume (V0) is of eerder als HEP is bereikt (maximaal 45 dagen na behandeling). Isolatie van de tumor en organen voor ex-vivo analyse. (biodistributie [REDACTED] in de organen, histologie)

: Voorkeur voor implantatie s.c. echter in voorkomende gevallen slaat de tumor beter aan in de spier (meer bloedvoorziening).

: indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring bij de VX2 tumor is dat >65% van de her-implantaties aanslaan.

Fase 4: Testen biocompatibiliteit in-vivo

Bepalen [REDACTED] release in het dier gedurende de tijd (**muis**)

- Onder een roesje worden de microsferen i.p. toegediend.
- Regelmatige controle op welzijn en gedrag gedurende de follow-up. Afwijkend gedrag t.o.v. de blanco geïnjecteerde dieren wordt gescoord.
- Gedurende de follow-up vindt er bloedafname plaats (maximaal [REDACTED] max 8 ml /kg/2wk) en [REDACTED] plaats (bij voorkeur [REDACTED] Terminatie op vaste tijdstippen (maximaal 6*; tot maximaal 1 jaar na behandeling) waarna de organen voor ex-vivo analyse worden geïsoleerd. (biodistributie [REDACTED] in organen, histologie)

Donor dieren:

Donor dieren rat:

- Onder anesthesie implantatie van tumorweefsel (zoals bv. De R1 tumor) in de flank[#]. Na voldoende tumorgroei om als donor te dienen terminatie waarna tumormateriaal wordt geïsoleerd voor implantatie bij nieuwe dieren (nieuwe donor en experimentele dieren).

: indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring binnen onze groep is dat 95% van de her-implanteerde dieren alsnog een tumor ontwikkelen na een tweede implantatie.

Donor dieren konijn:

- Na preventieve pijnstilling implantatie van tumorweefsel s.c. of i.m. op de achterpoot (of eventueel flank)^{#,##}. Na Voldoende tumorgroei om als donor te dienen terminatie waarna tumormateriaal wordt geïsoleerd voor implantatie bij nieuwe dieren (nieuwe donor en experimentele dieren).

: indien de tumor de eerste implantatie onverhoopt niet aanslaat kan deze procedure een tweede maal geprobeerd worden om zo het aantal dieren niet te hoeven vergroten. Ervaring bij de VX2 tumor is dat > 65% van de her-implantaties aanslaan.

##: Voorkeur voor implantatie s.c. echter in voorkomende gevallen slaat de tumor beter aan in de spier (betere bloedvoorziening).

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voordat de microsferen in de [REDACTED] worden getest, wordt eerst de stabiliteit uitvoerig in-vitro en ex-vivo getest. Geselecteerde formuleringen worden pas nadat gebleken is dat de compositie, grootte en stabiliteit en de [REDACTED] lekkage conform de eisen zijn op hun bio-compatibiliteit in vivo getest.

Gebruikte afkortingen:

[REDACTED]; onafhankelijk van elkaar uitgevoerd; en [REDACTED] per microsfeer; allen onafhankelijk van elkaar getest; (i.e. ms-A, ms-B, ms-C en ms-D; td-A; td-B) (*ms* = microsferen; *td* = toedieningsvloeistof; *ms-form.* = microsfeer formulering; [REDACTED]; [REDACTED])

Fase 2:

De groepsgrootte voor deze fase wordt bepaald volgens Chi^2 variance; distance from constant; one tailed.

Hierbij wordt als uitleesparameter de verdeling van de activiteit over de tumor gebruikt. Doel is [REDACTED] van de tumor met Holmiumdeeltjes verdeeld, controle vloeistof wordt [REDACTED] verdeeld (FZ). Effect is dan [REDACTED] Met een alfa van 5%, power van 80% wordt hier een groepsgrootte van [REDACTED] **dieren per groep** verkregen.

De groepen zijn als volgt gepland:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal [REDACTED] **groepen** per ontwikkelde microsfeer

([REDACTED])

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [REDACTED] microsfeer op [REDACTED] = 175 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal (4 * 175) = **700 ratten**.

Fase 3:

De groepsgrootte voor deze fase wordt bepaald volgens de t-test; difference between slopes; two tailed.

Hierbij wordt als parameter het verschil in tumorgroei tijd tot [REDACTED] gebruikt. Met een spreiding van ca. [REDACTED] een alfa van 5% en een power van 80% te verkrijgen komen we uit op **[REDACTED] dieren per groep**.

De groepen zijn als volgt gepland:

Hierbij zijn per ontwikkelde ms (n=4)

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal **[REDACTED] groepen** per ontwikkelde microsfeer

([REDACTED])

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [REDACTED] microsfeer op [REDACTED] = 49 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal (4 * 49) = **196 konijnen**.

Fase 4:

De groeps grootte voor deze fase wordt bepaald volgens de t-test; difference between slopes; two tailed.

Hierbij wordt als parameter het verschil in de negatieve effecten op de omliggende organen bepaald (Ho content; histologie). We hopen hier geen effect te vinden tussen de controles en de behandelde dieren. Een effect van [REDACTED] een alfa van 5% en een power van 90% te verkrijgen komen we uit op **[REDACTED] dieren per groep**. De gekozen power is hoger dan in fase 2 en 3 daar in deze fase de eerste onderzoeken voor veiligheid op langere termijn worden onderzocht.

De groepen zijn als volgt gepland:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Totaal maximaal **[REDACTED] groepen** per ontwikkelde microsfeer

([REDACTED])

Totaal komen we dan uit voor iedere ontwikkelde [REDACTED] microsfeer op [REDACTED] = 300 dieren per ontwikkelde microsfeer. Voor alle vier de ontwikkelde microsferen zijn dit maximaal (4 * 300) = **1200 muizen**.

Donoren:

Dit zijn dieren die dienen als tumordonor voor de experimentele dieren die in de komende jaren worden ingezet. Als er een periode is waarbij geen tumor gebruikt wordt worden er ook geen donor dieren ingezet. Binnen het [REDACTED] zijn er andere onderzoekers die hier mogelijk voor hun onderzoek gebruik van kunnen maken. Dit heeft in het verleden tot vermindering van donor dieren heeft geleid.

Voor zowel de rat als voor het konijn geldt:

- Per implantatie worden twee dieren ingezet als donor
- Tumor groei duurt 3-4 weken voor deze geoogst kan worden.
- Per jaar betekend dit 13 tot 17 maal overzetten (gem. 15)
- Totaal over 5 jaar: 5 jaar * 15 maal * 2 dieren = 150 dieren.

Totaal **maximaal 150 ratten over 5 jaar**

Totaal **maximaal 150 konijnen over 5 jaar**

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Fase 2:

Voor de ratten zijn er meerdere tumormodellen mogelijk zoals bijvoorbeeld de Nude-rat of WagRij rat met de R1-tumor (rhabdomyosaroom). Deze is al heel lang in gebruik, is erg stabiel groeit en goed doorbloed is.

Als proefdier is gekozen voor de rat omdat hiervan meerdere tumormodellen beschikbaar zijn, zoals bv. De R1 tumor in de Nude-rat of WagRij rat. Deze tumoren zijn groot genoeg voor een technisch uitvoerbare lokale injectie van een suspensie van [REDACTED] microsferen.

De dieren worden betrokken van een officiële leverancier in de EU, leeftijd van 6-8 weken. Op deze leeftijd is er voldoende "body" om de behandeling te kunnen verdagen; In verband met de [REDACTED] die wordt uitgevoerd na de behandeling met de [REDACTED] microsferen is de voorkeur voor vrouwelijke dieren. De mannelijke nude-ratten zijn al gauw te groot om met de µCT te kunnen worden gescand. Vrouwelijke dieren van ca. 11-12 weken wegen ca. 200 gram; mannelijke dieren zijn dan al 350 gram. Maximaal 4 * 175 dieren

Fase 3:

Als proefdier is gekozen voor het konijn omdat hiervan een bekend tumor model beschikbaar is. Daarbij zijn de tumoren groot genoeg om de effectiviteit van de radioactieve microsferen te onderzoeken. In deze fase ligt de nadruk op effectiviteit. Waarbij de dracht van het [REDACTED] maximaal 9 mm is. Dit aspect kan alleen in goed in een grotere tumoren van ca. 1.5 cm in doorsnede worden getest.

Hierbij wordt gebruik gemaakt van New Zealand White konijnen van een officiële leverancier in de EU; 8-10 weken; ca. 2.5-3.5 kg (*kunnen tumoren, zoals het VX2 tumor model, goed aan en ondervinden hier niet veel ongerief van*); Bij voorkeur vrouwelijke dieren. Dit i.v.m. groepshuisvesting, wat bij mannelijke dieren niet mogelijk is. Daarnaast is er bij mannelijke dieren risico op sproeien, wat met de radioactiviteit niet gewenst is i.v.m. veiligheid van medewerkers. Maximaal 4 * 49 dieren

Fase 4:

Als proefdier is gekozen voor de muis. Dit proefdier wordt ook in de standaard biocompatibiliteitstesten gebruikt wereldwijd. De hoeveelheden microsfeer suspensie en/of supernatant is aangepast aan de grootte van het proefdier. Hierbij wordt gebruik gemaakt van muizen, zoals de Balb/C van 4-6 weken. Betrokken van een officiële leverancier binnen de EU; Hierbij is de voorkeur voor vrouwelijke dieren, gezien de lange follow-up. Mannelijke dieren zijn niet in groepshuisvesting te huisvesten. Maximaal 4 * 300 dieren.

Donoren:

Rat:

Hierbij wordt gebruik gemaakt van ratten, zoals de Nude rat of de WagRij, van 6-8 weken (voldoende "body" om de behandeling te kunnen verdragen. De dieren worden betrokken van een officiële leverancier in de EU; Net als bij de experimenten wordt gekozen voor vrouwelijke dieren in verband met vergelijkbare tumorgroei. Maximaal 150 dieren.

Konijn:

Hierbij wordt gebruik gemaakt van New Zealand White konijnen van een erkende leverancier binnen de EU; 8-10 weken; ca 2.5-3.5 kg (*kunnen tumoren, zoals het VX2 tumor model, goed aan en ondervinden hier niet veel ongerief van*); Net als bij de experimenten wordt gekozen voor vrouwelijke dieren in verband met vergelijkbare tumorgroei. Maximaal 150 dieren

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☒ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Als er surplus dieren van de goede soort/stam/leeftijd beschikbaar zijn kunnen de deze dieren in deze studie gebruikt worden. Hergebruik dieren van bv gedragsonderzoek - afhankelijk van voorgaande handelingen en conditie - waarbij er geen farmaca zijn toegediend kunnen als donor of als experiment dier worden ingezet.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Ernstig ongerief is niet te verwachten, daar er al verschillende ████████-microsferen al in het dier (veterinair) of in de mens wordt toegepast. Ook hierin is

■■■■■ en ■■■■■ aanwezig. Voor translatie naar de mens is het wel nodig om dit in vivo te onderzoeken

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging:

Er wordt als eerste vele testen in-vitro / ex-vivo uitgevoerd om de veiligheid voor het dier zo hoog mogelijk te houden. Om de translatie naar de mens mogelijk te maken is het nodig om de microsferen in een heel organisme te testen. Hierdoor is het gebruik van dieren niet te voorkomen.

Vermindering:

Door statistische berekeningen worden er voldoende dieren per groep genomen om voldoende zekerheid te hebben van wat er uit de experimenten komt, zodat dit voldoende zou zijn om goede conclusies te kunnen trekken uit de resultaten.

Verfijning:

De dieren worden regelmatig gecontroleerd en waar nodig wordt pijnstilling toegepast of wordt het dier geëuthanaseerd als het humane eindpunt dreigt te worden bereikt. (wat niet te verwachten is).

Al het voorgestelde onderzoek zal gebruikt kunnen worden voor de registratie van deze microsferen in het zogenaamde "■■■■■" dat een belangrijk onderdeel zal vormen ■■■■■. Daarnaast zullen de biocompatibiliteit en effectiviteit een essentieel stuk vormen in de ■■■■■ om de translatie naar - en toepassing bij - de patiënt mogelijk te maken.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Gevoelige/pijnlijke handelingen worden uitgevoerd onder een lichte verdoving of anesthesie; in overleg met de IvD.

Daarnaast worden de dieren goed gecontroleerd en getraind op handelen. Dit zorgt ervoor de dieren het uitvoeren van de controles niet als stress-vol ervaren.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

A: Er zou irritatie ten gevolge van de nieuw ontwikkelde [REDACTED] micorsferen kunnen ontstaan. Hiervoor worden de dieren ook regelmatig gecontroleerd op algemene welzijnskenmerken (Gedrag, houding, verzorging, uiterlijk en sociale activiteiten) om dit voor te zijn.

B: Een paar groepen zullen de leeftijd van 1 jaar overschrijden en zouden daar ongerief van kunnen ondervinden. Voor de muizen (fase 4) is dit 17% van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

A: Lekkage van bestanddelen van de microsfeer of irritatie toedieningsvloeistof.

B: ouderdom

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Uitgebreide in-vitro testen vooraf; regelmatige diercontroles gedurende het experiment

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☒ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Fase 2: rat - HEP: tumorvolume $\geq 10\%$ van het lichaamsgewicht; ulceratie van de tumor; gewichtsverlies (20% t.o.v. begin; 15% binnen 2-3 dagen); verminderde (>1 dag) of afwezige activiteit; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

Fase 3: konijn - HEP: tumorvolume $\geq 10\%$ van het lichaamsgewicht; ulceratie van de tumor; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

Fase 4: muis - HEP: gewichtsverlies (20% t.o.v. begin; 15% binnen 2-3 dagen); verminderde (>1 dag) of afwezige activiteit; klinische verschijnselen die duiden op ongewenst ongerief.

We verwachten van de microsferen en toedieningsvloeistof zelf geen omstandigheden die humane eindpunt zouden opleveren. Zodra dit wel het geval zou zijn zal - eventueel in overleg met de dierenarts - het dier worden getermineerd.

De dieren die gedurende 12 maanden gevolgd worden worden ouder dan 1 jaar. Het is bekend dat spontane tumoren door veroudering kunnen ontstaan. Zodra dit welzijnsaantasting betekent is dit direct een reden voor euthanasie.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<1% mbt het beschreven protocol;

27% van de dieren binnen fase 4 worden ouder dan 1 jaar en zouden daar nadeel aan kunnen ondervinden.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Fase 2:

Onder narcose/roesje tumor implantatie; tumorgroei; [REDACTED] microsfeer injectie onder narcose + scan; follow-up met regelmatige controle; doden en

isolatie bloed en organen voor ex-vivo analyse. Het totale ongerief zal matig zijn.

Fase 3:

Na pijnstilling tumor implantatie; tumorgroei; ████████ microsfeer injectie onder narcose; scan onder narcose; follow up met scans onder narcose; regelmatige welzijnscontrole; doden en isolatie van organen voor ex-vivo analyse. Het totale ongerief zal matig zijn.

Fase 4:

injectie microsferen onder roesje; regelmatige welzijnscontrole; bloed/urine verzamelen; doden op vaste tijdstippen; isolatie organen voor ex-vivo analyse. Het totale ongerief zal matig zijn.

Donoren:

Bij de donoren wordt er een tumor geïmplant (bij de rat na een roesje) waarna er tumor groei plaats vindt. Totale ongerief zal matig zijn.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Isolatie van relevante organen voor Ex-vivo analyse (██████ content en histologie).

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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

AVD1150020171632

Bijlagen

1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 2 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie" met aanvraagnummer AVD1150020171632. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 10 mei en 31 mei 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd eventueel hergebruik en het ongerief van de dieren meer te beschrijven, u heeft bijlage 3.4.4.1 aangepast. Uw aanvraag is in de vergadering van 12 mei 2017 door de CCD besproken. De aanvraag is in deze vergadering aangehouden omdat er nog een aantal onduidelijkheden waren voor de CCD. Op 23 mei hebben wij u om aanvullende informatie gevraagd. U heeft deze vragen beantwoord, de documenten zijn op basis van uw antwoorden niet nogmaals aangepast. Uw aanvraag is in de vergadering van 2 juni 2017 opnieuw door de CCD besproken.

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 "Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juli 2017 tot en met 30 juni 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van een vergunning niet langer kan zijn dan 5 jaar.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Datum:
6 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020171632

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 26 april 2017. 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:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Datum:
6 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020171632

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: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juli 2017 tot en met 30 juni 2022, voor het project "Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale injectie" met aanvraagnummer AVD1150020171632, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Senior Onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Research biotechnicus verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 26 april 2017, ontvangen op 2 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 10 mei en 31 mei 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe holmium microsfeer formuleringen voor intratumorale toediening.				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	1.200	100% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	850	100% Matig	
	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) /	346	100% Matig	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:
AVD1150020171632

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:
AVD1150020171632

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:
AVD1150020171632

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.