

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 20173104	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	DEC-advies				x		x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x		
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x		

3104

1.

Centrale Commissie Dierproeven



23 AUG. 2017

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.centralecommissiedierproeven.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11400 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2"> </td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>64156338</td><td></td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>de Boelelaan</td><td>1117</td></tr><tr><td>Postbus</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>1081HV</td><td>Amsterdam</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2"></td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde			KvK-nummer	64156338		Straat en huisnummer	de Boelelaan	1117	Postbus			Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam	IBAN			Tenaamstelling van het rekeningnummer		
Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde																										
KvK-nummer	64156338																									
Straat en huisnummer	de Boelelaan	1117																								
Postbus																										
Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam																								
IBAN																										
Tenaamstelling van het rekeningnummer																										
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td colspan="2"> </td></tr><tr><td>Functie</td><td colspan="2"> </td></tr><tr><td>Afdeling</td><td colspan="2"> </td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2"> </td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2"> </td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters			Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres											
(Titel) Naam en voorletters																										
Functie																										
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres																										
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td colspan="2"> </td></tr><tr><td>Functie</td><td colspan="2"> </td></tr><tr><td>Afdeling</td><td colspan="2"> </td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2"> </td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2"> </td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters			Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres											
(Titel) Naam en voorletters																										
Functie																										
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres																										
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☐ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2"></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres											
(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.																								
Functie																										
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres																										

1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	☒ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> 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	
2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	☐ 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	
	☐ 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 <i>melding</i> 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	01-10-2017
	Einddatum	01-10-2022
3.2 Wat is de titel van het project?	Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
	Postadres	
	E-mailadres	

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning €1287 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.

Factuuradres:

Graag verzoeken we de CCD de factuur te versturen naar het factuuradres.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☒ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). 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

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.centralecommissiedierproeven.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

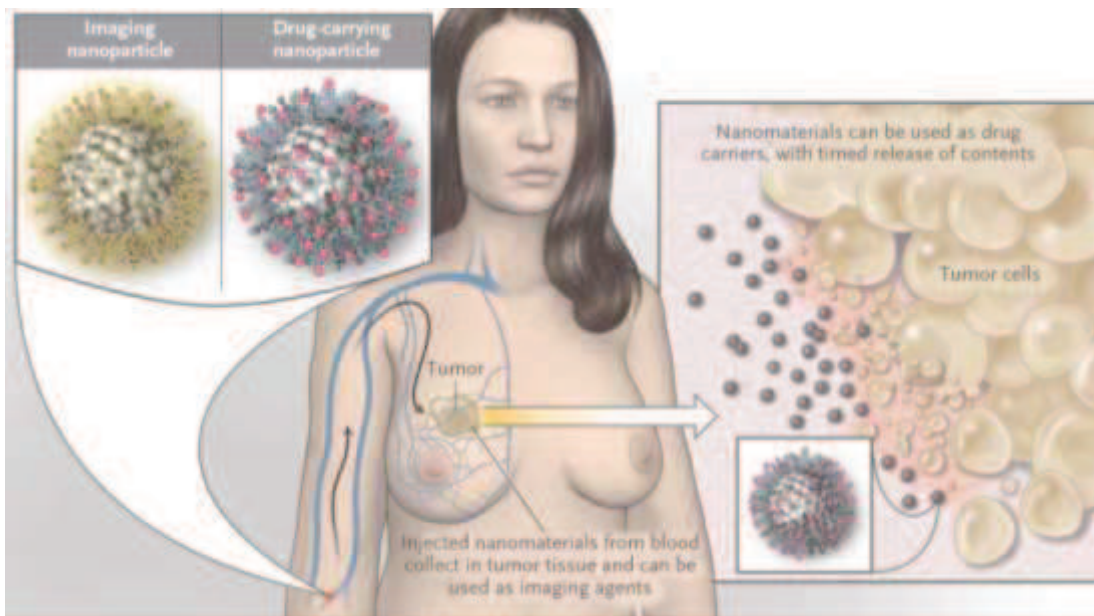
3.1 Achtergrond

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.

Achtergrond nanomedicine

Een van de onderzoeksvelden die binnen het kankeronderzoek veelbelovende resultaten laat zien is het gebruik van nanotechnologie in de geneeskunde, ofwel nanomedicine. Bij nanomedicine wordt gebruikt gemaakt van nanodeeltjes ter grootte van 10 tot 100 nm. Deze nanodeeltjes kunnen worden gevuld met bestaande medicatie en/of contrastmiddelen voor beeldvorming (zie figuur 1.) Vervolgens worden deze deeltjes intraveneus ingespoten en komen door het zogenaamde 'enhanced permeability and retention effect' (EPR-effect) bij de tumor terecht. Het EPR-effect ontstaat door de snelle groei van nieuwe bloedvaten in een tumor (ookwel neovasculatuur). Deze bloedvaten zijn slecht ontwikkeld waardoor er lekkende bloedvaten ontstaan. Deze lekkende bloedvaten zorgen ervoor dat nanodeeltjes uit de vaten kunnen treden en zich kunnen ophopen in de tumor en theoretisch minder in de overige delen van het lichaam. Doordat nanodeeltjes zich ophopen in de tumor kunnen ze zeer precies medicatie bezorgen op de plaats van bestemming en dus de zogenaamde 'biodistributie' van medicamenten verbeteren. En omdat in deze deeltjes tegelijkertijd medicatie en contrastmiddel kan zitten is het mogelijk om tegelijkertijd te behandelen en het effect van de behandeling in beeld te brengen. Dit geeft dan de mogelijkheid om minder effectieve behandelingen direct aan te passen.



Figuur 1. Een voorbeeld van het gebruik van nanodeeltjes. Rechtsboven 2 varianten, een nanodeeltje gevuld met contrast voor beeldvorming (links) en een nanodeeltje gevuld met bestaande medicatie (rechts). Belangrijk om te vermelden is dat dit ook tegelijkertijd zou kunnen zodat met een deeltje zowel therapie kan worden gegeven als contrastmiddel voor beeldvorming. Deze deeltjes worden in het vat gespoten en kunnen komen dan bij de tumor terecht middels het hierboven beschreven effect. (illustratie uit Nanomedicine, NEJM 2010)

Helaas is het afgelopen decennium gebleken dat nanomedicine nog niet de ideale therapie is. Nanodeeltjes accumuleren niet alleen in de tumor zoals gehoopt maar ook in andere organen, met name de lever en de milt. Uiteindelijk eindigen naar schatting maar 0,07% van de nanodeeltjes in de tumor. Daarnaast is ontdekt dat een tumor zich uiterst effectief kan verweren tegen deze deeltjes. Zo is er in vele tumoren sprake van heterogene verdeling van de neovasculatuur (de lekkende vaten) wat tegelijkertijd zorgt voor ineffektieve verspreiding van de nanodeeltjes. Vervolgens is er in de tumor sprake van een tumor micro-environment. In dit micro-environment is sprake van een verhoogde druk wat de deeltjes ervan weerhoudt zich vrij te verspreiden door de tumor. En tot slot wordt een overgroot deel van deze deeltjes opgenomen door immuuncellen ondanks vele strategieën om dit tegen te gaan.

Nano-immunotherapie

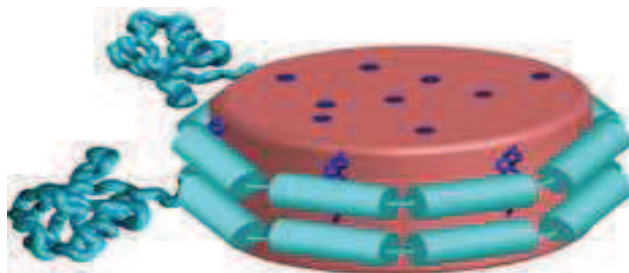
De behandeling van kanker is in de afgelopen jaren uitgebreid met de komst van de immunotherapie.

Deze vorm van behandeling maakt gebruik van het eigen immuunsysteem om de tumor aan te vallen. Dit kan door het immuunsysteem extra alert te maken (zoals met cytokine behandeling) of door immuunrespons remmende signalen te blokkeren (zoals met huidige antilichaam behandelingen). Immunotherapie heeft in de kliniek al bewezen effectief te zijn in de behandeling van kanker. Helaas heeft deze nieuwe therapie last van problemen. Bij deze nieuwe middelen is sprake van nieuwe bijwerkingen die zeer ernstig kunnen verlopen. Dit komt onder andere omdat deze medicatie systemisch gegeven wordt en dus door het hele lichaam verspreid wordt. Tot slot is het effect van deze medicatie beperkt tot een kleine groep patiënten en zijn deze middelen erg duur. Ondanks deze nadelen heeft immunotherapie geleid tot een revolutie binnen de kankerbehandeling.

Deze revolutie van de immunotherapie gaf daarnaast aanleiding tot een nieuwe visie in het veld van nanomedicine. Het combineren van immunotherapie en nanomedicine zou ervoor kunnen zorgen dat immunotherapie alleen bij de immuncellen wordt bezorgd. Zoals hierboven beschreven komen nanodeeltjes vaak terecht in de lever en de milt. In deze organen zitten veel immuncellen. En op deze manier kunnen nanodeeltjes makkelijk worden opgenomen door immuncellen. Het doel van nano-immunotherapie is om met het gebruik van nanodeeltjes immunotherapie te creëren die medicatie met minder bijwerkingen en hogere effectiviteit.

Het project

In ons project zullen wij gebruik gaan maken van nanodeeltjes die zijn gebaseerd op het menselijke HDL. HDL is beter bekend als het 'goede' cholesterol en komt natuurlijk in mensen voor (*zie figuur 2*). Dit deeltje wordt in het lichaam gevuld met vetten en deze worden op die manier door het lichaam getransporteerd. Het is echter mogelijk om middels bepaalde technieken dit deeltje te vullen met andere stoffen zoals bestaande medicatie. In eerdere onderzoeken door de aanvragers is dit deeltje gebruikt om succesvol medicatie en contrast voor beeldvorming te bezorgen. Er zijn 2 redenen waarom deze deeltjes geschikt zijn voor nano-immunotherapie. Allereerst de grootte van deze deeltjes. Deze deeltjes zijn afhankelijk van de mate van vulling tussen de 20 en 50 nm groot. In het lichaam worden deeltjes van die grootte snel opgenomen door de immuncellen. Deze eigenschappen gecombineerd maken het HDL-deeltje een geschikt platform om verder aan te passen en te verbeteren.



Figuur 2. Schematische weergave van HDL.

Binnen dit onderzoek willen wij het HDL-deeltje in het laboratorium aanpassen om te controleren of dit effect heeft op zijn functie. Bijvoorbeeld het aanpassen van de grootte, de inhoud en het aanpassen van de buitenkant (shell) van het deeltje. Ten eerste is het effect op de biodistributie van belang en of het mogelijk is om door bepaalde aanpassingen het nanodeeltje te laten accumuleren in bepaalde delen van het lichaam. Ten tweede willen wij kijken of wij de reactie van het immuunsysteem op het deeltje kunnen veranderen. Als kaal HDL wordt opgenomen reageert het immuunsysteem daar minimaal op omdat dit deeltje lichaamseigen is. Wij willen kijken of bij bepaalde manipulaties van het HDL-deeltje het mogelijk is om immuncellen te leren dat zij tumorcellen moeten aanvallen. Dit willen wij bereiken door bijvoorbeeld immuun stimulerende middelen uit het lichaam na te bootsen met dit deeltje zonder dat het zijn oorspronkelijke werking verliest. Tot slot willen wij de deeltjes die de eerste 2 stappen met succes doorlopen vullen met bestaande medicatie tegen kanker. Het idee is uiteindelijk dat het gemodificeerde deeltje uit het eerste deel van het onderzoek het immuunsysteem klaarmaakt om de tumor te bestrijden en dat de medicatie het immuunsysteem een extra zet kan geven. De nanodeeltjes die wij maken kunnen worden voorzien van radioactieve en/of fluorescente markers om zo beeldvorming van de

deeltjes mogelijk te maken ten tijde van de behandeling.

Door het immuunsysteem op deze manier te activeren zouden er in theorie minder bijwerkingen moeten optreden dan wanneer immunotherapie systemisch wordt gegeven. Dit komt omdat de medicatie in principe alleen op de benodigde plaatsen terecht komt. Verder hopen wij dat het combineren van bestaande medicatie met nanodeeltjes die uit zichzelf een immuunstimulerende werking hebben we een zeer krachtige immuunrespons op gang kunnen brengen. Wij maken in dit onderzoek gebruik van 5 verschillende types kankercellen namelijk: melanoom, longcarcinoom, colon carcinoom, mammacarcinoom, prostaat carcinoom. Deze tumoren hebben alle of een hoge incidentie en/of een hoge mortaliteit. Alle 5 deze type tumoren worden veel gebruikt in kankeronderzoek en hebben alle 5 verschillende kenmerken. Door verschillende types te kiezen kunnen wij onderzoeken of onze behandeling inderdaad een universeel effect heeft zoals verwacht. Deze types tumoren worden in de kliniek ook al behandeld met immunotherapie waardoor goed kan worden vergeleken of onze therapie verbetering geeft. Binnen het kankeronderzoek worden veel ontdekkingen gedaan. De aanvragers gebruiken deze types als uitgangspunt, maar wij willen benadrukken dat bij nieuwe resultaten wij eventueel tumortypes aanpassen of toevoegen. Zowel naar gelang wereldwijd onderzoeksresultaten als naar eigen onderzoeksresultaten.

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 hoofddoel van dit onderzoek is het ontwikkelen van nieuwe vormen van immunotherapie middels het gebruik van nanodeeltjes. Het is van belang dat deze immuuntherapie voor iedere patiënt effectief is. Deze nieuwe vormen moeten maximale effectiviteit hebben en minimale bijwerkingen.

Om het doel te kunnen bereiken zijn meerdere onderzoeksvragen van belang:

Dierproef 1

1. Wat is de biodistributie van de nanodeeltjes in vivo?
2. Wat is het immuunmodificerende effect van de nanodeeltjes?

Dierproef 2

3. Wat is de biodistributie en farmacokinetiek van de nanodeeltjes in combinatie met bestaande medicatie in vivo?
4. Wat is het immuunmodificerende effect van de nanodeeltjes in combinatie met bestaande medicatie?

Dit project beslaat een experimenteel onderwerp dat wordt betaald van een speciaal hiervoor behaalde beurs. Eerder onderzoek met andere nanodeeltjes met vergelijkbare deeltjes laten positieve resultaten zien aangaande de specificiteit voor immuuncellen. Voor dit onderzoek zullen wij werken met expertise uit verschillende Nederlandse onderzoeksinstituten en gaan wij een internationale samenwerking aan. De nanodeeltjes die wij gaan testen in vivo zijn vooraf uitgebreid in vitro onderzocht op toxiciteit en wij zullen tijdens de proeven nauwgezet volgen of er onverwachte bijwerkingen optreden. De aanvragers bezitten uitgebreide ervaring en kennis met muizen, tumormodellen en nanodeeltjes. De aanvragers en uitvoerders van het onderzoek hebben allemaal verscheidene publicaties binnen dit onderwerp. In het lab van de aanvragers zijn al eerder succesvolle dierproefaanvragen ingediend en zijn vele dierproeven succesvol uitgevoerd. Uitvoerende personen met minder ervaring (AIO's) zullen goed worden opgeleid door senior werknemers (postdocs, technici, professoren) met meer ervaring voor zij zullen starten met dierproeven. Bij dit onderzoek zijn geen ingewikkelde handelingen gepland, indien de komende jaren nieuwe technieken worden ontdekt zal eerst de benodigde kennis worden opgedaan en zullen de benodigde certificaten worden behaald. Ook zal waar nodig de hulp worden gevraagd van de verzorgenden en technici van het dierproefcentrum. Gezien de uitgebreide ervaring van de aanvragers,

de vergelijkbare proeven in de literatuur en de on-site kennis in het instituut schatten wij de haalbaarheid van dit onderzoek hoog in aangaande het succesvol verlopen van de proeven.

3.3 Belang

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

Het belang van dit werk is het maken van een nieuwe vorm van immunotherapie. Met andere woorden, middelen die uitsluitend een anti-tumor effect vertonen en geen bijwerkingen hebben. De huidige vormen van immunotherapie hebben gezorgd voor een significant betere overleving met minder bijwerkingen dan conventionele therapieën. Het ontwikkelen van nieuwe en innovatieve manieren van immunotherapie die naast minder bijwerkingen ook nog bruikbaar zijn voor alle patiënten is daarom zowel wetenschappelijk als maatschappelijk van groot belang.

Het maatschappelijke belang van dit project is groot. Vooralsnog zijn er bij een groot deel van de kankerpatiënten, zeker in het geval van uitgezaaide kanker, weinig mogelijkheden voor therapie. Het grootste belang is dus dat er uitzicht komt op een nieuwe en betere strategie voor de behandeling van patiënten met uitgezaaide kanker, maar ook dat het effect van de bestaande kanker behandelingen mogelijk beter gevolgd zal kunnen worden. Wanneer dit bereikt wordt zal de kwaliteit van leven van de kankerpatiënt worden verbeterd.

Het wetenschappelijk belang van dit onderzoek indien succesvol is aanzienlijk. De ontdekte nanodeeltjes met goed effect kunnen betrekkelijk makkelijk worden getranslationeerd. Hierdoor zijn klinische trials met deze deeltjes in betrekkelijk korte tijd niet ondenkbaar. Daarnaast zullen enkele nieuwe nanodeeltjes voor het eerst in vivo worden getest en deze zullen ook bruikbaar zijn voor andere onderzoekers. Met name de data over biodistributie van de nanodeeltjes zal van belang zijn.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De algemene doel van dit project is het ontwikkelen van een nieuwe vorm van immunotherapie met het gebruik van nanodeeltjes. Dit willen wij bereiken door middel van het modificeren van bekende HDL nanodeeltjes, zoals hierboven beschreven. Deze te combineren met een of meerdere vormen van medicatie (cytokines, antigene, antilichamen, chemotherapie, etc.). Deze deeltjes moeten in vivo worden getest op effectiviteit, distributie en toxiciteit. Hierbij is een muistumormodel van belang waarbij wij deeltjes injecteren. Met deze nanodeeltjes kunnen we tegelijkertijd beeldvorming toepassen en therapie geven.

Voor de start van de dierproeven zullen wij in vitro nieuwe deeltjes maken en op onverwachte bijwerkingen (b.v. celschade) en effectiviteit testen. Het doel is om voor de start van de dierproeven een selectie te hebben van ongeveer 20 verschillende nanodeeltjes. Wij zullen ons beperken in dit onderzoek tot 20 deeltjes in verband met de capaciteit. Deze nanodeeltjes zullen van elkaar verschillen in grootte en zullen verschillende aanpassingen in het ApoA1 eiwit bevatten. Dit zal in verschillende mate effect hebben op de biodistributie, het immuunsysteem en de tumor in vivo. Dit wordt onderzocht in dierproef 1. Na de eerste proef zullen deze deeltjes worden gecombineerd met bestaande therapeutische middelen in dierproef 2. Bij het in vivo onderzoek zal worden gelet op de farmacokinetiek en ongewenste bijwerkingen. Deze 2 uitkomstmaten vormen belangrijke indicatoren voor de verdere besluitvorming. Bij een teveel van onverwachte bijwerkingen in vivo of ongunstige biodistributie zal worden besloten het deeltje verder aan te passen of te stoppen met verder onderzoek met dit specifieke nanodeeltje. De mate van besluitvorming zal hieronder verder worden besproken.

Om het doel van dit onderzoek te kunnen bereiken zijn meerdere onderzoeksvragen belangrijk die met twee verschillende dierproeven worden beantwoord:

1. Wat is de biodistributie van de nanodeeltjes in vivo? (Dierproef 1)

Wij gaan een deel van de in vitro geteste nanodeeltjes in vivo controleren op biodistributie en onverwachte bijwerkingen. Hierbij zullen wij de gemaakte deeltjes voorzien van een radioactieve en/of fluorescente marker. Wij controleren voornamelijk op accumulatie in de milt, tumor, beenmerg, lever en lymfeklieren. Accumulatie in andere organen is minder gewenst maar is geen reden voor een 'no go' besluit.

2. Wat is het immuunmodificerende effect van de nanodeeltjes? (Dierproef 1)

Verscheidene formulaties van de door ons gemaakte nanodeeltjes zijn erop gericht om uit zichzelf een immuunmodificerend effect te hebben afhankelijk van het soort nanodeeltje (b.v. structuur van oppervlakte [shell]). Deze deeltjes zullen ook worden getest in vitro op onverwachte bijwerkingen en er zal hetzelfde onderzoek mee gedaan worden als hierboven beschreven. Er zal bij deze nanodeeltjes wel meer nadruk liggen op tumorgrootte. Ook zal er nadat de dieren gedood worden verder onderzoek gedaan worden op de verwijderde organen. Wij willen vaststellen of er effect is te zien bij het immuunsysteem van het dier op deze nanodeeltjes.

3. Wat is de biodistributie en pharmacokinetiek van de nanodeeltjes in combinatie met bestaande medicatie in vivo? (Dierproef 2)

Bij proef 2 gaan wij de in proef 1 onderzochte nanodeeltjes combineren met bestaande medicatie (cytokines, antigenen, antilichamen, chemotherapie, etc.). Hierbij willen we zien of de nanodeeltjes het (bij)werkingsprofiel van de gebruikte medicatie gunstig beïnvloeden. Wij verwachten dat met name immunomodulerende medicatie die systemisch veel bijwerkingen geven (zoals bijvoorbeeld cytokines en antigeen) verbetering zullen laten zien op het bijwerkingsprofiel. De betere biodistributie zou moeten zorgen voor minder eindorgaanschade van deze middelen. In deze proef zullen we onder andere vergelijken met de lege deeltjes en de 'normale' medicatie die niet in een deeltje zit. Omdat deze proef niet geheel overeenkomt (b.v. door andere volgorde toedienen, dosering, etc.) met die in type dierproef 1 is deze controle noodzakelijk. In deze proef zal voornamelijk controle zijn op biodistributie (van nanodeeltje en medicament) en eventuele onverwachte bijwerkingen.

4. Wat is het immuunmodificerende effect van de nanodeeltjes in combinatie met bestaande medicatie? (Dierproef 2)

De hierboven beschreven proeven geven ons een indicatie welke combinatie van nanodeeltjes en bestaande medicatie het maximale effect geeft. We verwachten een verhoging van de immunomodulerende effecten in vergelijking met de nanodeeltjes zonder bestaande medicatie. Verder krijgen we inzicht in de werking van deze deeltjes zodat ze eventueel verder geoptimaliseerd kunnen worden. Waarbij hierboven meer nadruk ligt op de eventuele bijwerkingen van de nanodeeltjes zal in dit subdoel voornamelijk worden gekeken naar de effectiviteit. Er zal dus gelet worden op tumorgrootte en de eventuele reactie van het immuunsysteem. Deze laatste stap combineert de informatie die is verkregen door de 3 onderzoeksvragen hiervoor en zal voor ieder nanodeeltje worden gebruikt om te kijken of verdere translatie mogelijk is.

Het volledige onderzoek zal bestaan uit 2 onderzoeksonderdelen, die aan elkaar zijn gekoppeld (zie *figuur 3*).

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

Beschrijving dierproef 1

Wij gaan in deze dierproef gebruikmaken van tumor dragende muizen die worden geïnjecteerd met verschillende soorten vormen van nanodeeltjes. Verscheidene formulaties van de door ons gemaakte nanodeeltjes zijn erop gericht om uit zichzelf een immuunmodificerend effect te hebben afhankelijk van het soort nanodeeltje (b.v. structuur van oppervlakte [shell]). De gebruikte nanodeeltjes zijn vooraf in vitro gecontroleerd op toxiciteit. Deze nanodeeltjes worden uitgerust met radioactieve of/en fluorescente marker zodat verscheidene varianten van beeldvorming in dezelfde proef kunnen worden uitgevoerd. De muizen zullen enkele weken worden vervolgd tenzij een humaan eindpunt wordt bereikt. De humane

eindpunten worden gekozen om te voorkomen dat het dier ernstig ongerief zal krijgen. Gedurende deze proef zal worden gelet op onverwachte bijwerkingen die het dier ongerief bezorgen. Uiteindelijk zullen de dieren worden gedood of worden de organen uitgenomen. Zo kunnen wij ex vivo verder onderzoek doen om het effect op de tumor en het immuunsysteem te controleren. Door deze twee punten van beeldvorming (in vivo en ex vivo) kunnen wij op macro en micro niveau zien hoe de biodistributie van de deeltjes is en of zij voldoende worden opgenomen door de immuuncellen. Zo willen vaststellen of er effect is te zien bij het immuunsysteem van het dier door deze nanodeeltjes met een immuunmodificerend effect.

Beschrijving dierproef 2

In deze dierproef worden de gemaakte deeltjes gecombineerd met bekende vormen van medicatie. Uit dierproef 1 hebben wij een uitgebreide bibliotheek aan deeltjes gecreëerd waarvan wij de benodigde kenmerken hebben. Wederom zullen wij de gemaakte deeltjes voorzien van een radioactieve en/of fluorescente marker zodat wij beeldvorming kunnen uitvoeren en zal aan het einde van de proef zullen de dieren worden gedood en zal verder onderzoek plaatsvinden op orgaan en celniveau. In dierproef 2 is meer nadruk op het effect van de deeltjes op de tumorgroei. Ook in deze dierproef zullen wij enkele nanodeeltjes gebruiken die op zichzelf een immuunmodificerend effect hebben. Wij hopen een synergistisch effect te zien na het toevoegen van medicatie bij deze deeltjes in vergelijking met nanodeeltjes zonder een inherent immuunmodificerend effect. Bij toxiciteit die zorgt voor een humaan eindpunt wordt het dier gedood en verder onderzocht. Bij tumorgroei worden de bekende humane eindpunten voor tumorgroei gebruikt.

Zie 3.4.3 voor een flowchart met de beschrijving van het project

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.

Het doel van dit onderzoek, het creëren van nieuwe vormen van nano-immunotherapie, vraagt een in eerste instantie brede aanpak. Zo zullen wij eerst starten met in vitro onderzoek van een groot aantal nanodeeltjes. In deze fase zal worden gekeken of de gemaakte nanodeeltjes toxisch zijn en of de gemodificeerde deeltjes nog functioneel zijn. Als een van deze 2 uitkomsten ongunstig is dan zal het nanodeeltje niet in vivo worden getest.

Beschrijving dierproef 1

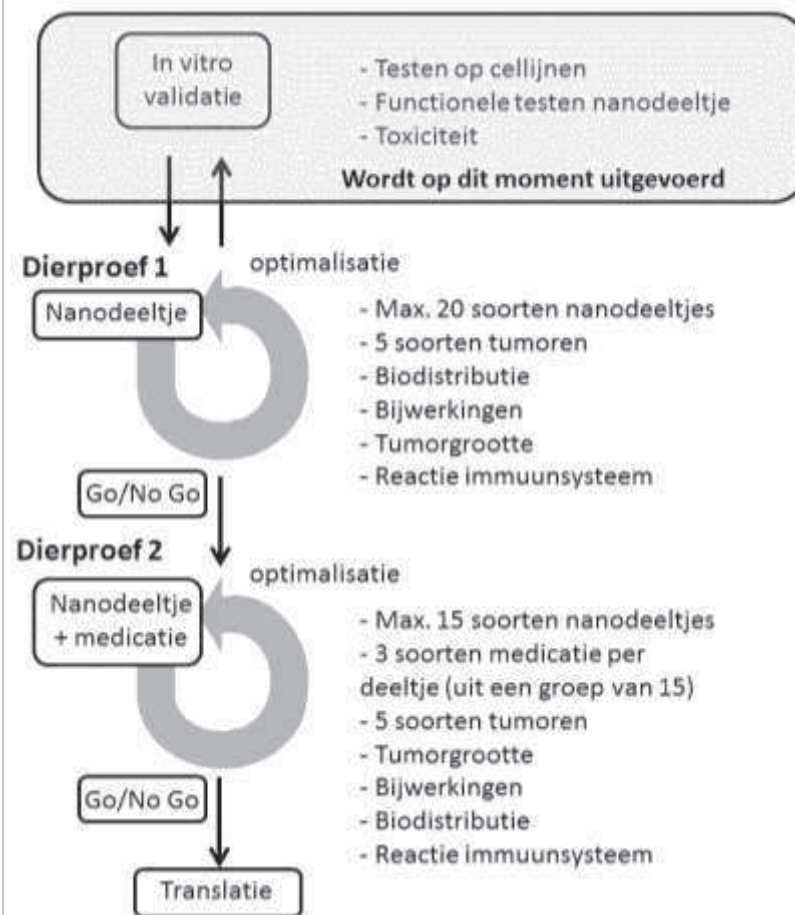
Dierproef 1 is het in vivo controleren van de in vitro geteste deeltjes. Hierbij zal voornamelijk worden gekeken naar het verschil in biodistributie, onverwachte bijwerkingen, de reactie van het immuunsysteem en effect op tumorgroei. Hierbij zullen wij de gemaakte deeltjes voorzien van een radioactieve en/of fluorescente markers zodat wij beeldvorming kunnen uitvoeren. In dierproef 1 zal bij onverwachte bijwerkingen en ongunstige biodistributie de nodige aanpassingen worden gedaan aan de nanodeeltjes. Bij onverwachte bijwerkingen is het noodzakelijk dat het deeltje aangepast wordt of dat er gestopt wordt met verder onderzoek naar met het specifieke nanodeeltje. Hier is sprake van een go/no go stap. Ongunstige biodistributie wordt in dierproef 1 gezien als het accumuleren van nanodeeltjes in organen anders dan de milt, het beenmerg, de tumor of de lymfeklieren. Ongunstige biodistributie is een minder hard criterium en zal alleen in uitzonderlijke gevallen gebruikt worden als go/no go beslissing. In deze fase van het onderzoek is het namelijk de bedoeling om te onderzoeken waar de nanodeeltjes terecht komen en deze informatie te gebruiken in dierproef 2. Accumulatie van deeltjes in organen (bijv. hersenen, longen, nieren) is daarom niet een reden tot een 'no go' besluit aangezien deze informatie kan worden gebruikt om tumoren in deze organen te bereiken. Het volledig ontbreken van accumulatie van deeltjes zal wel worden gebruikt om tot een 'no go' beslissing te komen omdat het deeltje dan geen nut zal hebben in dierproef 2. Effect op tumorgroei is wenselijk maar ontbreken hiervan is niet ernstig. Aan het einde van de proef zullen de dieren worden gedood en zal verder onderzoek plaatsvinden op orgaan en celniveau.

Beschrijving dierproef 2

In dierproef 2 van het onderzoek worden de gemaakte deeltjes gecombineerd met bekende vormen van

therapie en/of immunologische medicatie. Deze middelen zullen bestaan uit immunomodulerende medicamenten (checkpoint-inhibitoren, antigenen, adjuvant etc.). Uit de dierproef 1 van het onderzoek hebben wij een uitgebreide bibliotheek aan deeltjes gecreëerd waarvan wij de benodigde kenmerken zoals biodistributie hebben onderzocht en gedocumenteerd. Wederom zullen wij de gemaakte deeltjes voorzien van een radioactieve en/of fluorescente marker zodat wij beeldvorming kunnen uitvoeren en zal aan het einde van de proef zullen de dieren worden gedood en zal verder onderzoek plaatsvinden op orgaan en celniveau. In deze dierproef van het onderzoek is meer nadruk op de bijwerkingen van de toegevoegde medicatie en het effect van de deeltjes op de tumorgroei. Bij onverwachte bijwerkingen die dermate ernstig zijn dat zij zorgen voor het bereiken van een humaan eindpunt wordt het dier gedood en verder onderzocht. Bij tumorgroei worden de bekende humane eindpunten voor tumorgroei gebruikt.

Na ieder van deze 2 dierproeven is dus een duidelijk go/no go keuzemoment (zie *figuur 3, stroomdiagram*). De verwachting is dat van de oorspronkelijke max. 20 nanodeeltjes uit dierproef 1 er max. 15 nanodeeltjes in dierproef 2 worden getest.



Figuur 3: Flowchart van onderzoeksopzet. Bovenaan de in vitro proeven die worden uitgevoerd voor de in vivo proeven. Hierbij zal worden gekeken of de gemaakte nanodeeltjes toxisch zijn en of het eventueel gemodificeerde eiwit zijn natuurlijke werking heeft. Als een van deze 2 uitkomsten ongunstig is dan zal het nanodeeltje niet in vivo worden getest. Hier zal dus ook een Go/No Go beslissing plaatsvinden. Bij proef 1 zullen de in vitro geteste deeltjes in vivo worden getest. Hierbij zal worden gekeken naar onverwachte bijwerkingen en biodistributie. De verwachting is dat wij maximaal 20 soorten deeltjes gaan testen in 5 verschillende tumorvarianten. Er zal ook worden gekeken naar de tumorgrootte en de reactie van het immuunsysteem. De limiterende factor in proef 1 zijn de bijwerkingen. Bij onverwachte bijwerkingen die de muis ongerief bezorgen zal het deeltje weer teruggaan naar de in vitro fase of zal het deeltje niet verder worden gebruikt. Bij proef 2 zal aan het

nanodeeltje medicatie worden toegevoegd. Indien alle deeltjes uit proef 1 zonder bijwerkingen zijn zal het mogelijk zijn om ook in proef 2 maximaal 20 nanodeeltjes te onderzoeken. Omdat het uiterst onwaarschijnlijk is dat alle in proef 1 geteste nanodeeltjes geschikt zullen zijn voor verder onderzoek hebben we gekozen om maximaal 15 nanodeeltjes te testen in dierproef 2. Dit zal wederom gebeuren in 5 tumorsoorten. Wij zullen maximaal 15 verschillende varianten van medicatie worden gebruikt. Omdat het testen van alle 15 medicamenten in alle 15 soorten nanodeeltjes zal zorgen voor een te hoog aantal muizen zullen wij gebruik maken van kleine pilotstudies per medicament en zullen niet alle medicamenten in alle nanodeeltjes getest worden. De gebruikte medicamenten worden gekoppeld aan de nanodeeltjes waarvan wij uit proef 1 hebben bevestigd dat zij een gunstige biodistributie hebben voor de medicatie in kwestie. In proef 2 zijn alle 4 genoemde parameters van belang. Indien het deeltje niet

effectief is (tumorgrootte, biodistributie, reactie immuunsysteem) heeft het geen zin om het deeltje te transleren en zal het verder moeten worden ontwikkeld. Indien er sprake is van onverwachte bijwerkingen zal het deeltje ook verder worden geoptimaliseerd of zal worden besloten te stoppen met verder onderzoek van dit deeltje. Alleen bij een bewezen effectief deeltje met minimale bijwerkingen zal kunnen worden overwogen om verder onderzoek te doen met het specifieke deeltje.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes
2	Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes + bestaande medicatie
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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VUmc	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes

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.

Wij zullen eerst starten met in vitro onderzoek van een groot aantal nanodeeltjes. Van deze nanodeeltjes zullen enkelen van zichzelf al een immunomodulerend effect hebben op de tumor. In deze fase zal worden gekeken of de gemaakte nanodeeltjes onverwachte bijwerkingen hebben (b.v. celschade) en of de nanodeeltjes nog functioneel zijn. Als een van deze 2 uitkomsten ongunstig is dan zal het nanodeeltje niet in vivo worden getest. De verwachting is dat er van het oorspronkelijke aantal deeltjes er maximaal 20 door gaan voor in vivo testen. Deze verwachting is gebaseerd op ervaring van de aanvragers met eerdere vergelijkbare onderzoeken.

Bij dierproef 1 zal worden gekeken naar onverwachte bijwerkingen en biodistributie. Ook zal er worden gekeken naar de tumorgrootte en de reactie van het immuun systeem. De limiterende factor in proef 1 zijn de bijwerkingen. Bij onverwachte bijwerkingen die de muis ongerief bezorgen zal het deeltje weer teruggaan naar de in vitro fase of zal het deeltje niet verder worden gebruikt.

Wij gaan in deze dierproef gebruikmaken van tumor dragende muizen die worden geïnjecteerd met verschillende soorten nanodeeltjes. (Zie onderdeel A, tweede onderdeel) De nanodeeltjes worden intraveneus geïnjecteerd en worden uitgerust met radioactieve en/of fluorescente markers zodat verscheidene varianten van beeldvorming in dezelfde proef kunnen worden uitgevoerd. Deze beeldvorming zal op verscheidene tijdpunten plaatsvinden om zo de biodistributie te kunnen onderzoeken en zal plaatsvinden onder adequate anesthesie. De muizen zullen enkele weken worden gevolgd tenzij een humaan eindpunt wordt bereikt. Omdat verschillende type tumoren verschillende groei laten zien zal de duur van dierproef 1 per tumorsoort verschillen. De humane eindpunten worden gekozen om te voorkomen dat het dier ernstig ongerief zal krijgen. Gedurende deze proef zal worden gelet op onverwachte bijwerkingen die het dier ongerief bezorgen.

Uiteindelijk zullen de dieren worden gedood en worden de organen uitgenomen. Zo kunnen wij ex vivo verder onderzoek doen om het effect op de tumor en het immuunsysteem te controleren. Door deze twee punten van beeldvorming (in vivo en ex vivo) kunnen wij op macro en micro niveau zien hoe de biodistributie van de deeltjes is en of zij voldoende worden opgenomen door de immuuncellen.

De uitkomstparameters zijn: biodistributie, ongewenste bijwerkingen, immuunrespons, tumorgrootte/tumorgroei. De tumorgroei zal worden vergeleken met een controle groep, die geen behandeling krijgt. Tijdens de proef zullen tumorgroei-curves worden vastgelegd en de dieren regelmatig worden gewogen en op welzijn gecontroleerd. De algehele conditie van de dieren tijdens de proef kan namelijk aanwijzingen geven over de eventuele onverwachte bijwerkingen.

De groepen in een experiment in deze proefopzet zal er als volgt uitzien:

1. Controle groep
2. Controle groep leeg bekend nanodeeltje
3. Nieuw nanodeeltje

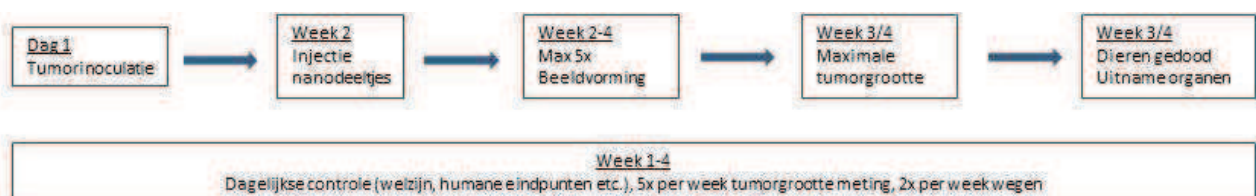
De eerste controle groep zal bestaan uit een groep dieren die injecties zal krijgen met NaCl 0,9% als controle. In dit onderzoek zullen we gebruik maken van een tweede controle groep waarbij we de muizen zullen injecteren met een al uitvoerig getest nanodeeltje. Omdat nanodeeltjes uit zichzelf effect hebben op het immuunsysteem is deze controlegroep van belang om het voordeel te onderzoeken van de door ons gemodificeerde nanodeeltjes. Indien er weinig variatie is in tumorgroei is het niet nodig bij ieder van deze nieuwe nanodeeltjes aparte controle groepen te gebruiken. Daarnaast gaan wij ervan uit dat we per controlegroep meerdere soorten nanodeeltjes kunnen onderzoeken. Echter is niet met zekerheid te zeggen of dit het geval is. Wij gaan hier uit van het maximaal benodigde aantal groepen maar het werkelijke aantal zal hoogstwaarschijnlijk lager zijn.

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.

Volwassen muizen (minimaal 8 weken oud) worden op de flank geïnjecteerd met tumorcellen. (B16-F10 melanoom (C57BL/6)/ TC-1 longcarcinoom (C57BL/6)/CT26 colon carcinoom (BALB/c)/MMTV-PyMT mammacarcinoom (FVB)/TRAMP-C1 prostaat carcinoom (C57BL/6). Deze tumoren hebben alle of een hoge incidentie en/of een hoge mortaliteit. Alle 5 deze type tumoren worden veel gebruikt in kankeronderzoek en hebben alle 5 verschillende kenmerken. Door verschillende types te kiezen kunnen wij onderzoeken of onze behandeling inderdaad een universeel effect heeft zoals verwacht. De aanvragers gebruiken deze types als uitgangspunt, maar wij willen benadrukken dat bij nieuwe resultaten wij eventueel tumortypes aanpassen of toevoegen. Indien wij tumortypes toevoegen zal een wijziging worden aangevraagd bij de CCD aangezien het aantal benodigde dieren dan zal veranderen. Zowel naar gelang wereldwijde onderzoeksresultaten als naar eigen onderzoeksresultaten.

Wanneer palpabele tumoren gegroeid zijn (20-50 mm³) worden de muizen geïnjecteerd met nanodeeltjes. De toedieningswijze van de geneesmiddelen is hetzelfde als die bij de mens namelijk intraveneus. Na de injectie met nanodeeltjes worden de muizen ook maximaal vijf keer beeldvorming onder anesthesie ondergaan om de biodistributie van de nanodeeltjes te volgen in de tijd.

Aangezien enkele van de door ons gemaakte nanodeeltjes van zichzelf effect zullen hebben op de tumorgroei zal tijdens de periode van tumorgroei zullen de muizen 2x per week worden gewogen en zal de tumorgrootte 5x per week worden gemeten met behulp van een schuifmaat. Door in dierproef 1 de tumorgrootte te controleren kunnen wij in dierproef 2 het effect bepalen van de toegevoegde medicatie. De proef zal worden beëindigd en de dieren worden gedood, wanneer de maximaal toegestane tumorgrootte van 2 cm³ is bereikt (dit is ongeveer 3/4 weken na tumorcelinjectie). Aangezien wij verschillende tumoren gebruiken tijdens dit onderzoek zal het onderzoek afhankelijk van de groei worden verkort of worden verlengd. Tumoren en organen zullen worden verwijderd voor verder onderzoek.



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

Ook weten we dat er doorgaans een vrij grote variatie in tumorgroei is tussen de dieren en daarom schatten we een groep van 10 dieren als behandelgroep en 10 dieren als controlegroep als realistisch in om een duidelijk effect van de behandeling op de tumorgroei waar te kunnen nemen. Dit kan zoals hierna beschreven statistisch worden onderbouwd met een voorbeeldberekening. Wanneer de aanname wordt gemaakt (volgend uit eerdere experimenten) dat eventuele behandeling 70% effectief is (uitkomstmaat tumorgroei), is de berekening als volgt:

n (behandel groep)=0.70, n (controle groep)=0, $k=10.5$ bij 90% power en $\alpha=0.05$, $\Delta=0.7$,
 $n_{\text{gemiddeld}} = (0+0.7)/2=0.35$

De volgende formule wordt ingevuld: $n \approx \frac{2 \times n_{\text{gemiddeld}} \times (1 - n_{\text{gemiddeld}}) \times k}{\Delta^2}$

$\Delta = n_a - n_b$

$n \approx \frac{2 \times 0.35 \times (1 - 0.35) \times 10.5}{0.7^2} = 9.75$ dus 10 dieren per groep

Rekening houdend met uitval van één muis per groep. Komen we uit op 11 dieren per groep.

B. De dieren

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

Muis, geslacht mannelijk/vrouwelijk, immuuncompetente volwassen (minstens 8 weken oud), maximaal 3300 dieren, erkende leverancier

Berekening van het maximaal aantal dieren:

20 soorten nanodeeltjes (schatting van aantal succesvolle deeltjes) x 5 soorten tumoren (om verschillen te controleren per tumor) x 1 toedieningsweg van medicatie (intraveneus) x 3x11 muizen (Interventie + 2x controle groep, zie berekening hierboven) = maximaal 3300 muizen

Bij het uitvoeren van deze proef zullen verscheidene nanodeeltjes worden uitgetest, ieder met unieke eigenschappen. Wij zullen in vitro een grote hoeveelheid deeltjes testen waar naar schatting waarschijnlijk maximaal 20 soorten zullen worden gebruikt in vivo. Daarnaast willen wij indien goeie resultaten worden verkregen uit de eerste ronde de experimenten nogmaals uitvoeren zoals hierboven beschreven.

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.

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.

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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging

Voor al deze proeven is een intact organisme nodig dat voldoende lijkt op de mens. De basis van deze proef is het ontdekken van de biodistributie van de gemaakte deeltjes. Helaas is er geen adequaat in vitro model

wat hier bij kan helpen. Daarnaast is de reactie van het afweersysteem, de tumorgroei en tumorbloedvatvorming op deze deeltjes zo complex dat het alleen in een diemodel kan worden bestudeerd. Muizen worden daarvoor wereldwijd als voldoende geschikt geacht, en kunnen dus niet vervangen worden door eenvoudigere organismen. Niettemin worden de geschiktheid van de nanodeeltjes pas in muizen getest na een uitgebreide validatie van de targets in in vitro door middel van proeven met cellijnen. Uitsluitend de deeltjes met minimale toxiciteit zullen worden getest in vivo om zo ernstige bijwerkingen bij de dieren te voorkomen.

Vermindering

We zullen de ontwikkelde nanodeeltjes eerst in vitro, door middel van proeven met cellijnen, testen. Een statistische analyse zal ook leiden tot vermindering van proefdieren. Op enkele plaatsen in de projecten zitten go/no-go beslismomenten, waarmee het aantal dieren efficiënt kan worden verminderd. Daarnaast zullen wij indien mogelijk de nanodeeltjes groeperen in proeven zodat minder controlegroepen nodig zijn. Waar mogelijk zullen wij ook controlegroepen hergebruiken om het aantal dieren verder te verminderen. Wereldwijd wordt de muis gebruikt voor kankeronderzoek, en vaak ook dezelfde modellen. Dit heeft als voordeel dat proeven kunnen onderling vergeleken worden en dat deze ervaring (met bijvoorbeeld doseringen) kan leiden tot vermindering.

Verfijning

De noodzakelijke dierproeven zullen uitsluitend uitgevoerd worden in de muis. Er is gekozen voor de muis, omdat dit wereldwijd een goed gevalideerd en erkend proefdiermodel voor kankeronderzoek is gebleken. Deze ervaring (met bijvoorbeeld doseringen) kan leiden tot vermindering van proefdiergebruik. Een ander groot voordeel van de muis is dat er voldoende muis specifieke reagentia (bijv. antilichamen) beschikbaar zijn om sluitend onderzoek te kunnen doen.

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.

De muizen zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn volgens de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek. De dieren zullen worden gescoord op gewicht, uiterlijk (vacht, ogen, neus en ademhalingsfrequentie) en gedrag zoals agressie, isolatie van de groep of verstopping.

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.

De aanvragers zitten reeds jaren in dit veld van onderzoek en hebben een groot overzicht over de andere onderzoeksgroepen in de wereld die met soortgelijk onderzoek bezig zijn. Omdat het in dit onderzoek gaat om nieuw ontwikkelde nanodeeltjes kan worden uitgesloten dat deze dierproeven al eerder zijn uitgevoerd.

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.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

X Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Tijdens de intraveneuze injectie van de nanodeeltjes, de beeldvorming en bij het doden van de dieren zal adequate anesthesie worden toegepast. Wij verwachten dat geen perioperatieve pijnbestrijding nodig is.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Effect van de behandeling op de organen, algehele malaise, injecties, anesthesie, beeldvorming, tumorgroei

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Aangezien het onbekend is welke biodistributie de nanodeeltjes hebben is het mogelijk dat er sprake zal zijn van therapie op plaatsen die ongewenst zijn. En dan voornamelijk op de lever. Ook zijn bij klassieke medicamenten en immunomodulerende medicatie de daar bijbehorende bijwerkingen te verwachten.

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

De humane eindpunten opgenomen in de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek zullen worden gehanteerd.

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.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tumorgrootte > 2 cm³, gewichtsverlies >15%, niet eten of normaal drinken, problemen met de motoriek, gescheurde/ulceratie tumor, ethisch niet aanvaardbare tekenen van pijn criteria gebaseerd op Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek.

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

Minder dan 5%

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.

Procedures	Categorie	Percentage	Duur
1. Verkrijgen muizen, transport	licht	100%	30 min
2. Interventies			
a. Subcutane injectie tumorcellen	licht	100%	10 min
b. Staartvene injectie nanodeeltjes/placebo	licht	100%	10 min
c. Beeldvorming onder anesthesie	licht	100%	20 min
3. Tumorgroei	matig	30%	1 week
	licht	70%	¾ weken
4. Bijwerkingen nanodeeltjes	licht	100%	½ dagen
4. Doden onder anesthesie	licht	100%	2 min

Cumulatief wordt het ongerief voor 70% van de dieren als licht en voor 30% van de dieren als matig ingeschat. Tumorgroei zonder enkele mate van pijn of ongerief wordt als licht ingeschat. Minimale tekenen van pijn, ongerief of verandering van activiteit zien wij als matig. Ernstig ongerief wordt voorkomen door de gestelde humane eindpunten.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

De tumoren en organen van de muizen zullen worden gebruikt voor verdere analyse, daarom is het doden van de dieren essentieel. Ook is het wanneer de maximale tumorgrootte is bereikt niet ethisch om de dieren te laten leven.

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.

X Ja



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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VUmc	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes + medicatie

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In proef 2 zullen wij het effect op tumorgroei en het effect op het immuunsysteem van onze met medicatie gevulde nanodeeltjes (gevuld met cytokines, antigenen, antilichamen, chemotherapie, etc.) controleren. Daarnaast zal wederom worden gekeken naar onverwachte bijwerkingen en de biodistributie. Wij gaan in deze dierproef gebruikmaken van tumordragende muizen die worden geïnjecteerd met verschillende soorten vormen van nanodeeltjes. Deze muizen worden op de flank geïnjecteerd met tumorcellen. De proef zal, zoals hierboven besproken, plaatsvinden in verscheidene tumorsoorten met corresponderende diersoorten (B16-F10 melanoom (C57BL/6)/ TC-1 longcarcinoom (C57BL/6)/CT26 colon carcinoom (BALB/c)/MMTV-PyMT mammacarcinoom (FVB)/TRAMP-C1 prostaat carcinoom (C57BL/6)) om zo een duidelijk overzicht te krijgen van het effect van de deeltjes op verschillende tumorsoorten. Deze tumoren hebben alle of een hoge incidentie en/of een hoge mortaliteit. Alle 5 deze type tumoren worden veel gebruikt in kankeronderzoek en hebben alle 5 verschillende kenmerken. Door verschillende types te kiezen kunnen wij onderzoeken of onze behandeling inderdaad een universeel effect heeft zoals verwacht. De aanvragers gebruiken deze types als uitgangspunt, maar wij willen benadrukken dat bij nieuwe resultaten wij eventueel tumortypes aanpassen of toevoegen. Zowel naar gelang wereldwijd onderzoeksresultaten als naar eigen onderzoeksresultaten.

De nanodeeltjes worden intraveneus geïnjecteerd en worden uitgerust met radioactieve of/ en fluorescente marker zodat verscheidene varianten van beeldvorming (bijv. CT, MRI, PET-CT) in dezelfde proef kunnen worden uitgevoerd. Deze beeldvorming, die maximaal vijf keer zal plaatsvinden, zal op verscheidene tijdstippen plaatsvinden om zo de biodistributie en de tumorgroei te kunnen onderzoeken en zal plaatsvinden onder adequate anesthesie. De muizen zullen enkele weken worden gevolgd tenzij een humaan eindpunt wordt bereikt. De humane eindpunten worden gekozen om te voorkomen dat het dier ernstig ongerief zal krijgen. Gedurende deze proef zal worden gelet op onverwachte bijwerkingen die het

dier ongerief bezorgen.

Uiteindelijk zullen de dieren worden gedood en worden de organen uitgenomen. Zo kunnen wij ex vivo verder onderzoek doen om het effect op de tumor en het immuunsysteem te controleren. Door deze twee punten van beeldvorming (in vivo en ex vivo) kunnen wij op macro en micro niveau zien hoe de biodistributie van de deeltjes is en of zij voldoende worden opgenomen door de immuuncellen.

De uitkomstparameters zijn: biodistributie, ongewenste en onverwachte bijwerkingen, immuunrespons, tumorgrootte/tumorgroei. In deze proef zijn verscheidene controle groepen vereist. Om de tumorgroei te vergelijken zal 1 groep geen behandeling krijgen. Daarnaast zal bij 1 groep een nanodeeltje worden geïnjecteerd met een voor de aanvragers en in de literatuur bekende biodistributie ter controle. Ook zal ter controle een groep geïnjecteerd worden met alleen de medicatie om zo inzicht te krijgen in het effect van de betere biodistributie van de medicatie op tumorgroei en of de medicatie verpakt in het nanodeeltje een gunstiger bijwerkingsprofiel heeft. Tijdens de proef zullen tumorgroei-curves worden vastgelegd en de dieren regelmatig worden gewogen en op welzijn gecontroleerd.

De groepen in een experiment in deze proefopzet zal er als volgt uitzien:

Pilotstudie dierproef 2:

1. Losse medicatie
2. Medicatie in nanodeeltje dat getest is in dierproef 1

Dierproef 2:

1. Controle groep
2. Controle groep leeg bekend nanodeeltje
3. Controle groep injectie met medicatie
4. Controle groep injectie met medicatie in leeg bekend nanodeeltje (van controle groep 2)
5. Medicatie in nanodeeltje uit proef 1

De eerste controle groep zal bestaan uit een groep dieren die injecties zal krijgen met NaCl 0,9% als controle. In dit onderzoek zullen we gebruik maken van een tweede controle groep waarbij we de muizen zullen injecteren met een al uitvoerig getest nanodeeltje. Wij maken gebruik van pilot studies om de biodistributie te testen zodat hier minder controle groepen nodig zijn. Het hercontroleren van de biodistributie is ook in dierproef 2 noodzakelijk omdat het vullen van het nanodeeltje met medicatie de vorm en grootte kan veranderen en dit in enkele gevallen een effect kan hebben op de biodistributie. De mate van vulling met verschillende medicamenten is vooraf niet te voorspellen en daarom is het noodzakelijk om in dierproef 2 nogmaals de biodistributie te controleren.

Indien er weinig variatie is in tumorgroei is het niet nodig bij ieder van deze nieuwe nanodeeltjes aparte controle groepen nodig. Daarnaast gaan we ervanuit dat wij per controlegroep meerdere soorten nanodeeltjes kunnen onderzoeken. Echter is niet met zekerheid te zeggen of dit het geval is. Tot slot is het mogelijk om controlegroepen uit proef 1 te hergebruiken indien er sprake is van weinig variatie in tumorgroei. Wij gaan hier uit van het maximaal benodigde aantal groepen maar het werkelijke aantal zal hoogstwaarschijnlijk lager zijn.

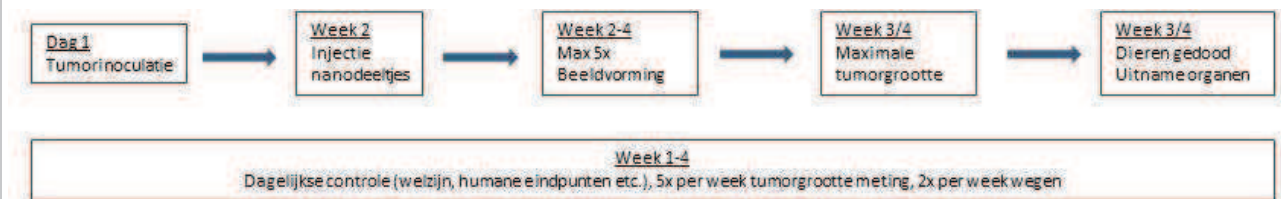
Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Volwassen muizen (minimaal 8 weken oud) worden op de flank geïnjecteerd met tumorcellen. Verschillende diermodellen: (B16-F10 melanoom (C57BL/6)/ TC-1; longcarcinoom (C57BL/6)/CT26; colon carcinoom (BALB/c)/MMTV-PyMT; mammacarcinoom (FVB)/TRAMP-C1; prostaat carcinoom (C57BL/6). Deze tumoren hebben alle of een hoge incidentie en/of een hoge mortaliteit. Alle 5 deze type tumoren worden veel gebruikt in kankeronderzoek en hebben alle 5 verschillende kenmerken. Door verschillende types te kiezen kunnen wij onderzoeken of onze behandeling inderdaad een universeel effect heeft zoals verwacht. We gebruiken deze types als uitgangspunt, maar we willen benadrukken dat bij nieuwe resultaten eventueel tumortypes worden aangepast of toegevoegd (zowel naar gelang wereldwijde onderzoeksresultaten als naar eigen onderzoeksresultaten).

Wanneer palpabele tumoren gegroeid zijn (20-50 mm³) worden de muizen geïnjecteerd met nanodeeltjes. In deze proef zullen de nanodeeltjes worden gevuld met medicatie. Naar verwachting gebruiken wij maximaal 15 soorten verschillende medicamenten (cytokines, antigenen, antilichamen, chemotherapie, etc.). (zie deel B De toedieningswijze van de geneesmiddelen is hetzelfde als die bij de mens (bijv. intraveneus (in

de bloedbaan), subcutaan (onhuids), intramusculair (in de spier) of oraal (via de mond)).

De therapie zal doorgang vinden totdat de muizen tumoren van 2000 mm³ hebben ontwikkeld of tot andere humane eindpunten zijn bereikt. Tijdens de therapie worden de zullen de muizen ook maximaal vijf keer beeldvorming onder anesthesie ondergaan om de biodistributie van de nanodeeltjes en de tumorgroei te controleren en te volgen in de tijd. Tijdens de periode van tumorgroei zullen de muizen 2x per week worden gewogen en zal de tumorgrootte 5x per week worden gemeten met behulp van een schuifmaat. De proef zal worden beëindigd en de dieren worden gedood, wanneer de maximaal toegestane tumorgrootte van 2 cm³ is bereikt (dit is ongeveer 3 weken na tumorcelinjectie). Tumoren en organen zullen worden verwijderd voor verder onderzoek.



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

Ook weten we dat er doorgaans een vrij grote variatie in tumorgroei is tussen de dieren en daarom schatten we een groep van 10 dieren als behandelgroep en 10 dieren als controlegroep als realistisch in om een duidelijk effect van de behandeling op de tumorgroei waar te kunnen nemen. Dit kan zoals hierna beschreven statistisch worden onderbouwd met een voorbeeldberekening.

Wanneer de aanname wordt gemaakt (volgend uit eerdere experimenten) dat eventuele behandeling 70% effectief is (uitkomstmaat tumorgroei), is de berekening als volgt:

n (behandel groep)=0.70, n (controle groep)=0, $k=10.5$ bij 90% power en $\alpha=0.05$, $\Delta=0.7$,
 $n_{\text{gemiddeld}} = (0+0.7)/2=0.35$

De volgende formule wordt ingevuld: $n \approx \frac{2 \times n_{\text{gemiddeld}} \times (1 - n_{\text{gemiddeld}}) \times k}{\Delta^2}$

$\Delta = n_a - n_b$

$n \approx \frac{2 \times 0.35 \times (1 - 0.35) \times 10.5}{0.7^2} = 9.75$ dus 10 dieren per groep

Rekening houdend met uitval van een muis per groep. Komen we uit op 11 dieren per groep.

B. De dieren

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

Muis, geslacht mannelijk/vrouwelijk, immuuncompetente volwassen (minstens 8 weken oud), maximaal 5925 dieren, erkende leverancier

Pilot:

15 soorten nanodeeltjes x 3 medicamenten (hierbij gaan wij uit van 15 soorten nanodeeltjes omdat de verwachting is dat niet alle nanodeeltjes succesvol door dierproef 1 komen daarnaast worden de medicamenten gekoppeld aan de nanodeeltjes waarvan wij uit proef 1 hebben bevestigd dat zij een gunstige biodistributie hebben voor de medicatie in kwestie) x 5 soorten tumoren x 2x4 muizen (in deze pilotstudies gaan wij uit van 2 groepen. 1 groep met losse medicatie en 1 groep met medicatie in het geteste nanodeeltje. Zo kunnen wij subdoel 1 van proef 2 namelijk het controleren of er sprake is van betere biodistributie en minder bijwerkingen voldoende controleren) = 1800 muizen

Dierproef 2 onderzoeksvraag 4:

15 soorten combinaties (van nanodeeltjes + medicatie) x 5 soorten tumoren x 5x11 muizen (zie groepen zoals hierboven beschreven) = 4125 muizen

Dit brengt het totaal aantal muizen op $1800 + 4125 = 5925$ muizen voor proef 2.

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.

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.

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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging

Voor al deze proeven is een intact organisme nodig dat voldoende lijkt op de mens. De basis van deze proef is het ontdekken van de biodistributie van de gemaakte deeltjes. Helaas is er geen adequaat in vitro model wat hier bij kan helpen. Daarnaast is de reactie van het afweersysteem, de tumorgroei en tumorbloedvatvorming op deze deeltjes zo complex dat het alleen in een diermodel kan worden bestudeerd. Muizen worden daarvoor wereldwijd als voldoende geschikt geacht, en kunnen dus niet vervangen worden door eenvoudigere organismen. Niettemin worden de geschiktheid van de nanodeeltjes pas in muizen getest na een uitgebreide validatie van de targets in in vitro door middel van proeven met cellijnen. Uitsluitend de deeltjes met minimale toxiciteit zullen worden getest in vivo.

Vermindering

We zullen de ontwikkelde nanodeeltjes eerst in vitro, door middel van proeven met cellijnen, testen. Een statistische analyse zal ook leiden tot vermindering van proefdieren. Op enkele plaatsen in de projecten zitten go/no-go beslistmomenten, waarmee het aantal dieren efficiënt kan worden verminderd. Daarnaast zullen wij in proef 2 gebruik maken van pilotstudies om zo een inschatting te kunnen maken nuttige combinaties. Dit zal zorgen voor een grove vermindering van het werkelijk aantal benodigde dieren. Tot slot zullen wij indien mogelijk de nanodeeltjes groeperen in proeven zodat minder controlegroepen nodig zijn. Waar mogelijk zullen wij ook controlegroepen hergebruiken om het aantal dieren verder te verminderen. Wereldwijd wordt de muis gebruikt voor kankeronderzoek, en vaak ook dezelfde modellen. Dit heeft als voordeel dat proeven kunnen onderling vergeleken worden en dat deze ervaring (met bijvoorbeeld doseringen) kan leiden tot vermindering.

Verfijning

De noodzakelijke dierproeven zullen uitsluitend uitgevoerd worden in de muis. Er is gekozen voor de muis, omdat dit wereldwijd een goed gevalideerd en erkend proefdiermodel voor kankeronderzoek is gebleken. De ervaring met deze diermodellen (en met bijvoorbeeld doseringen) kan leiden tot vermindering van proefdiergebruik. Een ander groot voordeel van de muis is dat er voldoende muis specifieke reagentia (bijv. antilichamen) beschikbaar zijn om sluitend onderzoek te kunnen doen.

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.

De muizen zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn volgens de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek. De dieren zullen worden gescoord op gewicht, uiterlijk (vacht, ogen, neus en ademhalingsfrequentie) en gedrag zoals agressie, isolatie van de groep of verstopping.

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.

De aanvragers zitten reeds jaren in dit veld van onderzoek en hebben een groot overzicht over de andere onderzoeksgroepen in de wereld die met soortgelijk onderzoek bezig zijn. Daarnaast, aangezien hier het effect van een nieuwe gemaakte nanodeeltjes bestaat kan worden uitgesloten dat deze dierproeven al

eerder zijn uitgevoerd.

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 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 > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Tijdens de intraveneuze injectie van de nanodeeltjes, de beeldvorming en bij het doden van de dieren zal adequate anesthesie worden toegepast. Wij verwachten dat geen perioperatieve pijnbestrijding nodig is.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Effect van de behandeling op de organen, algehele malaise, injecties, anesthesie, beeldvorming, tumorgroei

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Aangezien het onbekend is welke biodistributie de nanodeeltjes hebben is het mogelijk dat er sprake zal zijn van therapie op plaatsen die ongewenst zijn. En dan voornamelijk op de lever. Ook zijn bij klassieke medicamenten en immunomodulerende compounds de daar bijbehorende bijwerkingen te verwachten.

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

De humane eindpunten opgenomen in de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek zullen worden gehanteerd.

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.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tumorgrootte > 2 cm³, gewichtsverlies > 15%, niet eten of normaal drinken, problemen en met de motoriek, gescheurde/ulceratie tumor, ethisch niet aanvaardbare tekenen van pijn criteria gebaseerd op Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek

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

Minder dan 5%

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.

Procedures	Categorie	Percentage	Duur
1. Verkrijgen muizen, transport	licht	100%	30 min
2. Interventies			
a. Subcutane injectie tumorcellen	licht	100%	10 min
b. Staartvene injectie nanodeeltjes/placebo	licht	100%	10 min
c. Staartvene injectie medicatie	licht	100%	10 min
d. Beeldvorming onder anesthesie	licht	100%	20 min
3. Mogelijke bijwerkingen van de medicatie	matig	30%	½ dagen
3. Tumorgroei	matig	30%	1 week
	licht	70%	¾ weken
4. Bijwerkingen nanodeeltjes	matig	30%	½ dagen
4. Doden	licht	100%	2 min

Cumulatief wordt het ongerief voor 70% van de dieren als licht en voor 30% van de dieren als matig ingeschat. De variatie van ongerief bij tumorgroei is een professionele inschatting van de aanvragers gebaseerd op de variatie in tumorgroei (zowel binnen groepen als variatie tussen verschillende tumorsoorten). Tumorgroei zonder enkele mate van pijn of ongerief wordt als licht ingeschat. Minimale tekenen van pijn, ongerief of verandering van activiteit zien wij als matig. Ernstig ongerief wordt voorkomen wij door de gestelde humane eindpunten.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

De tumoren en organen van de muizen zullen worden gebruikt voor verdere analyse, daarom is het doden van de dieren essentieel. Ook is het wanneer de maximale tumorgrootte is bereikt niet ethisch om de dieren te laten leven.

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.

X Ja

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
Het NVWA nummer is 11400
2. Titel van het project:
Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker
3. Titel van de NTS:
Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker
4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC: *15-06-2017*
 - ☐ aanvraag compleet: *15-06-2017*
 - ☐ in vergadering besproken: *27-06-2017 en 11-07-2017*
 - ☐ anderszins behandeld: *n.v.t.*
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: *27-06-2017 tot 30-06-2017 en 14-07-2017 tot 25-07-2017*
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - ☐ aanpassing aanvraag: *30-06-2017, 25-07-2017 en 21-08-2017*
 - ☐ advies aan CCD: *21-08-2017*
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
 - Datum advies IvD: *15-06-2017*
 - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1

- Datum: *27-06-2017*
- Strekking gestelde vragen: *Er zijn nog teveel onduidelijkheden, met name m.b.t. de proefopzet en de handelingen aan de dieren dat er besloten is dat de aanvraag op een volgende plenaire DEC vergadering moet terugkomen. De DEC is van mening dat de NTS nog niet voldoende overeenkomst met de inhoud van het projectvoorstel. De achtergrond is erg warrig. Welke processen spelen een rol bij de toepassing van nano-deeltjes? De opzet van de doelen en fasering van het onderzoek is nog*

niet helder/navolgbaar. Onderbouw de keuze voor de controle groepen. Er moet meer uitleg komen bij de 3V's.

- Datum antwoord: 30-06-2017

- Strekking van de antwoord(en): *Er is meer uitleg toegevoegd over de deeltjes en het effect daarvan. Opbouw veranderd, meer nadruk op nano-deeltjes. Deel 3.4 in het geheel herestructureerd. Meer uitleg toegevoegd. Nadruk dat dit het maximaal benodigde aantal dieren is. Verwachting is lager omdat controle groepen kunnen worden hergebruikt en therapiegroepen kunnen worden gegroepeerd. Controle groep 1 is volledig blank, controlegroep 2 is een leeg nano-deeltje wat uit zichzelf al effect kan hebben op het dier, groep 3 is de interventie waarbij we hopen dat het een gewenst effect laat zien. Waar in dierproef 1 de nadruk ligt op biodistributie is bij dierproef 2 voornamelijk de tumorgrootte van belang. Er zal een kleine pilotstudie worden gedaan om zo het effect van verscheidene medicamenten af te kunnen zetten tegen medicatie zonder nano-deeltje. Schema met tijdsbeloop toegevoegd.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. De aangepaste aanvraag zal besproken worden tijdens de eerstvolgende DEC vergadering (11 juli).*

Vraagronde 2

- Datum: 14-07-2017

- Strekking gestelde vragen: *3.1 De DEC leden zien graag nog dat er nog wordt toegevoegd wat immunotherapie nu precies is? Graag aan 3.4.2 nog uitleg toevoegen over het immuun modificerende effect. De DEC verneemt graag of deze extra tumorsoorten ook onder dit project vallen? De vraag van de DEC is waarom de onderzoekers niet al in dierproef 1 de nano-deeltjes vullen met een oplosmiddel (bv. saline)? omdat dit effect op de biodistributie heeft. Onderdeel K, voeg hier toe: toedienen van medicatie.*

- Datum antwoord: 25-07-2017

- Strekking van de antwoord(en): *Uitleg en voorbeelden in tekst gezet. Indien wij tumortypes toevoegen zal een wijziging worden aangevraagd bij de CCD aangezien het aantal benodigde dieren dan zal veranderen. Het controleren van de biodistributie is noodzakelijk omdat een leeg nano-deeltje de vorm heeft van een munt en een gevuld deeltje de vorm heeft van een klein bolletje. Toevoegen van oplosmiddelen is niet mogelijk. Er kunnen alleen vet oplosbare middelen in die allemaal een effect zouden hebben en wij zo onduidelijke resultaten krijgen in deel 1. Medicatie toegevoegd.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

Vraagronde 3

- Datum: 21-08-2017

- Strekking gestelde vragen: *De aantallen in de bijlagen komen niet overeen met de aantallen in de NTS. In bijlage 2 is sprake van 5925 dieren? Dan word het totaal 9925 dieren.*

- Datum antwoord: 21-08-2017

- Strekking van de antwoord(en): *De aantallen kwamen inderdaad niet overeen, moet 5925 dieren zijn in bijlage 2, dit is aangepast.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*

3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom: *n.v.t., geen van de DEC leden is betrokken bij dit project.*

C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).: *n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie translationeel onderzoek is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

Tumoren bestaan naast kankercellen uit allemaal andere soorten van 'zieke' cellen die een tumor helpen groeien. Een deel van deze zieke cellen zijn onze eigen afweercellen, deze voeren niet meer hun normale werk uit maar helpen de kankercellen met groeien. In dit project is het de bedoeling om met behulp van extreem kleine nano-deeltjes deze cellen weer omzetten naar gezonde (anti-kanker) afweercellen. De eigen afweer, het immuunsysteem, wordt zo gebruikt als therapie tegen kankertumoren.

Het directe doel van dit onderzoek is het ontwikkelen van nieuwe vormen van immuuntherapie middels het gebruik van nano-deeltjes, zogeheten 'Nano-immunotherapie'. Het uiteindelijke doel van de studie is om verscheidene soorten van deze deeltjes te maken en deze te combineren met medicatie, om zo een nieuwe effectievere behandeling tegen kanker te kunnen ontwikkelen. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel te bereiken.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de

kankerpatiënten. De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor de kankerpatiënten bevorderd worden: De kennis opgedaan met dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van betere behandelingsopties voor kankerpatiënten.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: *n.v.t*

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder, en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen bijdragen aan het beschikbaar komen van betere behandelingsopties voor kankerpatiënten. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opbouw en de financiële ondersteuning.

Welzijn dieren

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

De locatie van de dierproef is binnen de instelling van de vergunninghouder. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De dieren krijgen adequate verdoving.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.

De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

Het cumulatieve ongerief is voor 30% van de dieren matig en voor 70% van de dieren licht. Het transport, het inspuiten van tumorcellen en nano-deeltjes en/of medicatie, de beeldvorming onder anesthesie en het doden van de dieren veroorzaken licht ongerief. Daarnaast kunnen er mogelijke bijwerkingen optreden bij het gebruik van de nano-deeltjes en/of bij gebruik van de medicatie, dit veroorzaakt licht tot matig ongerief. De tumorgroei zal zorgen voor licht (bij 70%) tot maximaal matig ongerief (bij 30% van de dieren). De variatie van ongerief bij de tumorgroei en de bijbehorende percentages zijn een inschatting van de aanvragers, gebaseerd op vroegere variatie in tumorgroei bij eerdere experimenten.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de injecties, tumorgroei en het doden.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

De criteria voor de humane eindpunten zijn goed gedefinieerd.

De criteria zijn gebaseerd op de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek: Tumorgrootte > 2 cm³, gewichtsverlies >15%, niet eten of normaal drinken, problemen en met de motoriek, gescheurde/ulceratie tumor of ethisch niet aanvaardbare tekenen van pijn criteria. Gebaseerd op eerdere experimenten verwacht men dat minder dan 5% van de dieren het humane eindpunt bereikt.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.

Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Om te kunnen zien of de nieuwe nano-immunotherapie werkt is een intact organisme nodig dat voldoende lijkt op de mens. Om te kijken of de nano-deeltjes wel op de goede plek aankomen (biodistributie), het gewenste effect hebben en of er geen bijwerkingen optreden, is het noodzakelijk proefdieren te gebruiken. Dit is helaas niet mogelijk in celkweek. De geschiktheid van de nano-deeltjes zal echter pas in muizen getest worden na een uitgebreide validatie van de targets in celkweekexperimenten. Daarnaast is de reactie van het afweersysteem, de tumorgroei en tumorbloedvatvorming zo complex dat het op dit moment alleen in een diermodel kan worden bestudeerd.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Er is gekozen voor de muis, omdat dit wereldwijd een goed gevalideerd en erkend proefdiermodel voor kankeronderzoek is gebleken. Een ander groot voordeel van de muis is dat er voldoende muis specifieke reagentia (bijv. antilichamen) beschikbaar zijn om aansluitend onderzoek te kunnen

doen. Ook hebben de aanvragers veel ervaring met muisexperimenten, zodat de kans op het herhalen van experimenten minimaal is.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.

Door het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een statistische analyse wordt voorkomen dat er teveel (of te weinig) dieren worden gebruikt. Indien mogelijk zullen de nano-deeltjes worden gegroepeerd, zodat minder controlegroepen en dus minder dieren nodig zijn. Wereldwijd wordt de muis gebruikt voor kankeronderzoek, en vaak ook dezelfde modellen. Dit heeft als voordeel dat proeven onderling vergeleken kunnen worden en dat de ervaring (met bijvoorbeeld doseringen) kan leiden tot vermindering.

Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 9225 muizen acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd.

Passende anesthesie zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel. De muizen zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn volgens de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek. De dieren zullen worden gescoord op gewicht, uiterlijk en gedrag en indien nodig worden de humane eindpunten toegepast.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

Tijdens de experimenten zal men gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood

worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

De experimenten kunnen niet uitgevoerd worden zonder dat de dieren gedood worden, de tumoren en organen van de muizen zullen worden gebruikt voor verdere analyse. Er wordt een dodingsmethode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is: *n.v.t.*

NTS

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

De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag

Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

Rechtvaardigt het ontwikkelen van een nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker het gebruik van maximaal 9225 muizen die daarvan licht tot matig ongerief ondervinden?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af.

De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden licht tot matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: Voordeel vanwege de kennisontwikkeling over de nano-immunotherapie. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: veel voordeel wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van betere behandelopties voor kankerpatiënten.

De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 9225 muizen, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van meer kennis over de nano-immunotherapie is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het ontwikkelen van nieuwe vormen van immuuntherapie

middels het gebruik van nano-deeltjes, om zo een nieuwe effectievere behandeling tegen kanker te kunnen ontwikkelen. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van betere behandelingsopties voor kankerpatiënten dankzij nano-immunotherapie, is afgewogen tegen het, licht tot matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 9225 muizen, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het maatschappelijk belang is substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen naar verwachting bijdragen aan het beschikbaar komen van betere behandelingsopties voor kankerpatiënten.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 9225 muizen en het daarbij verwachte lichte tot matige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

Er is geen dilemma geconstateerd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1140020173104

Bijlagen

2

Datum 22 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 augustus 2017. Het gaat om uw project "Nano-immunotheraPie voor de behandeling van kanker". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1140020173104. 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:

22 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020173104

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020173104

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 64156338
Straat en huisnummer: de Boelelaan 1117
Postcode en plaats: I181 HV AMSTERDAM

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020173104

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Adres: van der Boechhorststraat 1
Postcode en plaats: 1081 BT AMSTERDAM
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

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 oktober 2017
Geplande einddatum: 1 oktober 2022
Titel project: Nano-immunotheraPie voor de behandeling van kanker
Titel niet-technische samenvatting: Nano-immunotheraPie voor de behandeling van kanker
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: ☒ [x] Projectvoorstel
☒ [x] Beschrijving Dierproeven
☒ [x] Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: ☒ [x] Melding Machtiging
☒ [x] DEC-advies

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: Amsterdam
Datum: 21 augustus 2017

Datum:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020173104



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM


**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1140020173104

Bijlagen

2

Datum 22 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 22 augustus 2017
Vervaldatum: 21 september 2017
Factuurnummer: 173104

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1140020173104	€ 1.287,00

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.



Centrale Commissie Dierproeven

7.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM
|||||

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1140020173104
Bijlagen
1

Datum 19 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 21 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker" met aanvraagnummer AVD1140020173104. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

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

U kunt met uw project "Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning niet voor langer dan 5 jaar mag worden afgegeven.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 21 augustus 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.

Datum:
19 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020173104

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



M. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam

Adres: de Boelelaan 1117

Postcode en plaats: 1181 HV AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022, voor het project "Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker" met aanvraagnummer AVD1140020173104, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Promovendus.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 21 augustus 2017, ontvangen op 21 augustus 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes				
	Muizen (Mus musculus) /	3.300	30% Matig 70% Licht	
3.4.4.2. Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes + medicatie				
	Muizen (Mus musculus) /	5.925	30% Matig 70% Licht	

Aanvraagnummer:

AVD1140020173104

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in 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:
AVD1140020173104

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:

AVD1140020173104

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

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