

Inventaris Wob-verzoek W17-07									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS2017841	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Machtiging				x		x	x	
7	DEC-advies				x				
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Verzoek om nadere aanvulling CCD				x		x		
10	Reactie op verzoek om nadere aanvulling CCD			x					
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x		



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>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 11400 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>64156338</td><td></td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>de Boelelaan</td><td>1117</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]		KvK-nummer	64156338		Straat en huisnummer	de Boelelaan	1117			
Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	64156338																
Straat en huisnummer	de Boelelaan	1117															
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>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>	Postbus			Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam	IBAN			Tenaamstelling van het rekeningnummer					
Postbus																	
Postcode en plaats	1081HV	Amsterdam															
IBAN																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[REDACTED]																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Onderzoeker		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Onderzoeker																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|------------|
| Startdatum | 01-06-2017 |
| Einddatum | 31-05-2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Nieuwe therapieën voor de behandeling van hersentumoren
- 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 | Amsterdam Nederland |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287

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.

* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.

Inkoopordernummer: [REDACTED]

Factuuradres:

Afdeling Crediteuren, VU Medisch Centrum, [REDACTED]
[REDACTED]

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

Appendici 1 en 2

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). 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 [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Amsterdam

Datum 23 - 01 - 2017

Handtekening [REDACTED]



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11400
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. VUmc
- 1.3 Provide the title of the project. New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

In the Netherlands, each year around 1500 people are diagnosed with a cancer in the brain (www.cijfersoverkanker.nl). These brain tumours can be a primary tumour, which originates from brain tissue or a secondary tumour, which has metastasized from a different location towards the brain. The majority of primary brain tumour patients have a dismal prognosis with a survival of only several months

to a few years. Treatment options for these groups of patients are very limited as most malignant tumours of the CNS grow in a very invasive fashion, with cells spreading throughout the brain.

Although brain tumours are most common in the elderly, they occur in every age group. In children, brain tumours even constitute the main cause of cancer-related death (Mueller & Chang 2009), and median survival and therapy response are even worse for children than for adults. One of the main obstacles hampering therapy in children is that radiation of the brain is not possible in young children - under age 3 - due to severe side effects in this age group (Packer et al. 2013). Another obstacle for effective treatment of aggressive brain tumours, in both adults and children, is that chemotherapy often fails due to the existence of the blood-brain barrier. Under normal circumstances, this barrier functions as a 'filter' to protect the brain from harmful substances. In brain tumours however, this barrier also prevents therapeutics from reaching the tumour, thereby causing tumour resistance to therapy. Furthermore, cells in different topological locations within the brain behave differently. Cells in different locations have different patterns of resistance to drugs, thus impeding (the development of) effective drug-based therapy. Patient outcome is also impaired because brain tumours display a large heterogeneity, both between patients and within one tumour (Inda et al. 2010; Northcott et al. 2012; Taylor et al. 2012; Louis et al. 2007). This heterogeneity makes it difficult to attack all tumour cells with a single therapeutic agent. Finally, the diffuse growth characteristics and the location of the tumour hamper complete surgical removal. Also radiotherapy, which is directed mainly to the tumour core to spare the surrounding brain tissue, is not very effective in these diffuse tumours. Cells outside the tumour core will survive and cause tumour recurrence. Consequently, radiotherapy - often in combination with chemotherapy - offers an improvement in survival of only several months.

This project describes firstly the induction of brain tumours in mice and secondly the use of therapeutic interventions to treat these brain tumours. These animal experiments aim to provide insight into the biology of malignancies of the central nervous system, optimize existing therapies, discover novel drugs, therapeutic targets and strategies and to enable effective delivery of pharmaceuticals.

In the example below we demonstrate a performed study which illustrates the interaction and coherence between the research objectives, and give an indication of typical timelines. Moreover, it shows the good interaction between our research group and the clinic, imaging facility, drug development department, and external research partners. The study started with an [REDACTED] on a child which had died due to a malignant brain tumour.

"A [REDACTED] year old [REDACTED] died [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] resulting in a delay of disease related symptoms of several weeks as compared to the control group."

With the findings of the proposed animal experiments of this project we aim to find new ways to treat some of the most difficult to treat tumours in current day oncology and provide a platform for the translation of laboratory findings towards clinical trials.

3.2 Purpose

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

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

The main objective of the proposed study is to develop new therapeutic strategies for the treatment of brain cancer. To achieve this, we will develop new brain tumour models and test therapeutic options on both these new and existing brain tumour models.

The objective, although ambitious, is within reach of the capabilities of our research group and the proposed project is feasible within 5 years. Over the past years, our research group has significantly contributed to the discovery and development of novel therapeutic strategies for brain tumour patients. Our research group has substantial funding for this project and is embedded in a large consortium of research groups within the [REDACTED]. [REDACTED] includes the departments [REDACTED].

[REDACTED] Furthermore, we have active collaborations with other institutes including [REDACTED].

[REDACTED] These partners will supply us with all the technical know-how for techniques including imaging, molecular characterization and compound preparation. Our research group has all the necessary expertise regarding brain tumour biology, animal handling and performing of the animal experiments. We follow literature as closely as possible and are participating in international scientific meetings and are well aware of what is going on in the brain cancer research field. To prevent duplication of research at our institute, we centralize all brain tumour research via the [REDACTED].

The project will consist of two experimental objectives which are strongly intertwined within each other.

These 2 experimental objectives are:

1) **Develop brain tumour model.**

Brain tumours will be induced by transplantation of human primary tumour material obtained from the operating theatre or from autopsy; by transfer of cell lines from a donor mouse to a recipient; or with the use of established cell lines.

Transplantation of human primary tumour material is necessary to develop new brain tumour models which represent the tumour heterogeneity. If this tumour material forms a tumour in the injected mice, the cells will be processed *in vitro* before re-injecting them to new donor mice.

Transplantation of *in vitro* cell lines into donor mice is necessary for testing therapeutic interventions.

Tumour progression will be monitored with relevant imaging and analysis techniques as depicted in the attached appendices. After killing the animals, brains can be processed for histological analysis to unravel mechanism of tumour progression or for DNA/RNA profiling and proteomics to detect novel pathways.

2) **Brain tumour treatment.**

Therapeutic strategies for the treatment of brain cancer will be tested in induced brain tumour models. The therapeutics are chosen after extensive *in silico* and *in vitro* testing as depicted in Figure 1. The dosing will be based on already known pharmacokinetic and toxicity data. The route of administration will depend on the ability of the therapeutic to by-pass the BBB, as denoted in the decision tree in the attached appendices 1 and 2.

Therapy effectiveness or tumour progression will be observed by imaging techniques including MRI, [REDACTED] and BLI or measurement of tumour specific markers in blood or serum. To see if therapeutics bypass the BBB techniques such as MRI with contrast enhancement, [REDACTED] or *ex vivo* characterization of tissues are being used.

Figure 2 (section 3.4.1) shows the maximum number of mice which can enter each experimental phase of this project and what the expected discomfort is at these experimental phases. Furthermore, this Figure 2 shows the strong coherence between the two types of experiments.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

Despite the efforts in brain tumour research during the last centuries, only limited progress has been made regarding the prognosis of these brain tumour patients. For example, the median survival time of glioblastoma patients has only improved from 10 months in 1990 to 15 months at present (Woehrer et al. 2014). This underlines the importance of research in this specific area of oncology. The research is needed to improve our understanding of the development and progression of brain tumours; to develop novel therapeutic agents and to develop administration strategies to treat brain tumours. Additionally, many parts of this project will have an impact on other fields of research; a better understanding of the blood-brain barrier for example, will certainly help research into other neurological disorders, such as Alzheimer's disease or Multiple Sclerosis. A major advantage is the existence of research groups studying these disorders within the same university ensuring a dual benefit from these developments. Furthermore, the brain tumour models as described above will gain fundamental insight into the progression of cancer in general and discovery of novel therapeutic targets or strategies. These will obviously have an impact on research in other areas of oncology.

Social relevance:

With 1500 patients diagnosed with cancer in the central nervous system each year in the Netherlands across all ages, the impact on society of these diseases can be considered to be high. Importantly, the lack of effective therapeutic strategies, and in the case of paediatric glioma of any evidence-based treatment, creates a hopeless situation for all persons involved, including families and friends. Additionally, since brain tumours can occur at every age, and given the impact on the patients' social life, these diseases have large economic consequences in terms of healthcare costs and loss of productivity. The aims of this project not only aim to improve survival of brain tumour patients, but also the quality of life of patients and thereby, indirectly, of their relatives and social system.

3.4 Research strategy

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

As of today, the standard treatment for high grade brain tumours is surgical resection – which never removes all cancer cells – followed by radiotherapy, chemotherapy with temozolomide, or both radiotherapy and chemotherapy simultaneously. Unfortunately, this prolongs survival of patients with high grade tumours by a few months only. Our laboratory research is focused on identifying new therapeutic targets aimed at reducing tumour growth and/or sensitizing tumour cells to radiotherapy or chemotherapy.

For the identification of therapeutic targets, cell lines are a useful instrument. Many brain tumour cell lines are available to study different aspects of brain cancer. However, as the World Health Organization (WHO) recognizes approximately 190 different molecular subtypes of brain tumours (Louis et al. 2016), there is still a lack of representative models for many of these tumour subtypes. In order to develop therapeutic strategies with a high potential of actually being effective in patients, there is a need for more, well-characterized, cell lines representing this tumour heterogeneity. We focus on high grade brain tumours, which are tumours that have the worst patient outcome. Because many cell lines do not grow

immediately *in vitro* after the collection of tumour cells directly from patients, it is necessary to inject these tumour cells immediately after the operation or autopsy procedure into the mouse. At the time of obtaining the tumour cells, the exact molecular subtype is not known yet. If this results in tumour engraftment, the cells can be re-collected from this donor mouse and these newly-derived cell lines often have gained the capacity to grow *in vitro*. These newly derived cell lines will be used alongside the already known, well-described, cell lines for the development of new treatment strategies.

New treatment targets strategies are identified from *in silico* and *in vitro* analyses. This is done by the use of several laboratory techniques, including RNA sequencing and screening of drug-libraries on the cell lines, but also literature studies, or *in silico* analysis. Moreover, collaborations with our national and international research partners will give us new leads to identify and develop novel therapeutics. These newly identified therapeutic agents can include chemotherapeutics, small molecules, biologicals, nanoparticles and gene targeting therapies. These can be tested as single agents or in combination with one another to improve anti-tumour efficacy in the heterogeneous brain tumours.

In vitro tests are also used to predict toxicity in order to limit unwanted side effects, morbidity and mortality. In order to translate the laboratory findings to clinical trials, we will establish the safety and efficacy of (combinations of) compounds in the appropriate animal models. Additionally, new strategies and applications to circumvent or modify the blood-brain barrier, such as [REDACTED], will be developed and tested, either alone or in combination with aforementioned compounds, to improve drug delivery to the site of the tumour. Figure 1 illustrates the overall design of this project from the collection of patient-derived materials via *in vitro* testing and animal experiments towards clinical application.



Figure 1: Different research phases to go from patient-derived tumour material to clinical application

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

In this project, the main animal procedure will be intracranial injection of tumour cells. Tumour cells will be selected based on the brain tumour (sub)type, growth characteristics, presence or absence of molecular targets, or other relevant parameters. For tumour induction, tumour cells will be injected into the brain of a suitable mouse strain. Appropriate anaesthesia and pain control will be applied before, during and after this surgical procedure. Tumour progression will be monitored by measurement of blood values or one or more imaging techniques including bioluminescence imaging, intravital microscopy, [REDACTED] MRI, CT or [REDACTED]. Based on the experimental question, the relevant technique, or combination of techniques, will be chosen (see appendices 1 and 2 for details).

The wellbeing of the mice will be monitored by observing the behaviour of the mice, measuring body weight and, if applicable, neuronal activity (EEG) or behaviour.

The second type of animal experiments is the administration of therapeutic agents. The administration route and dosing for therapeutic interventions will be based on available information with respect to toxicity, distribution and kinetics of the compound and predicted (or proven) ability to pass the blood-brain-barrier (see appendix 2 for details).

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

Figure 2 describes the relation between the two types of animal experiments, namely tumour transplantation and treatment. 'Go/No Go' selection points are explained in the figure legend.

Typical time lines for the tumour engraftment are 1-4 weeks for cell lines and up to 1.5 year for primary tumour materials. Treatment studies have a follow up of several weeks for fast growing cell lines to up to 1 year for slow growing cell lines.

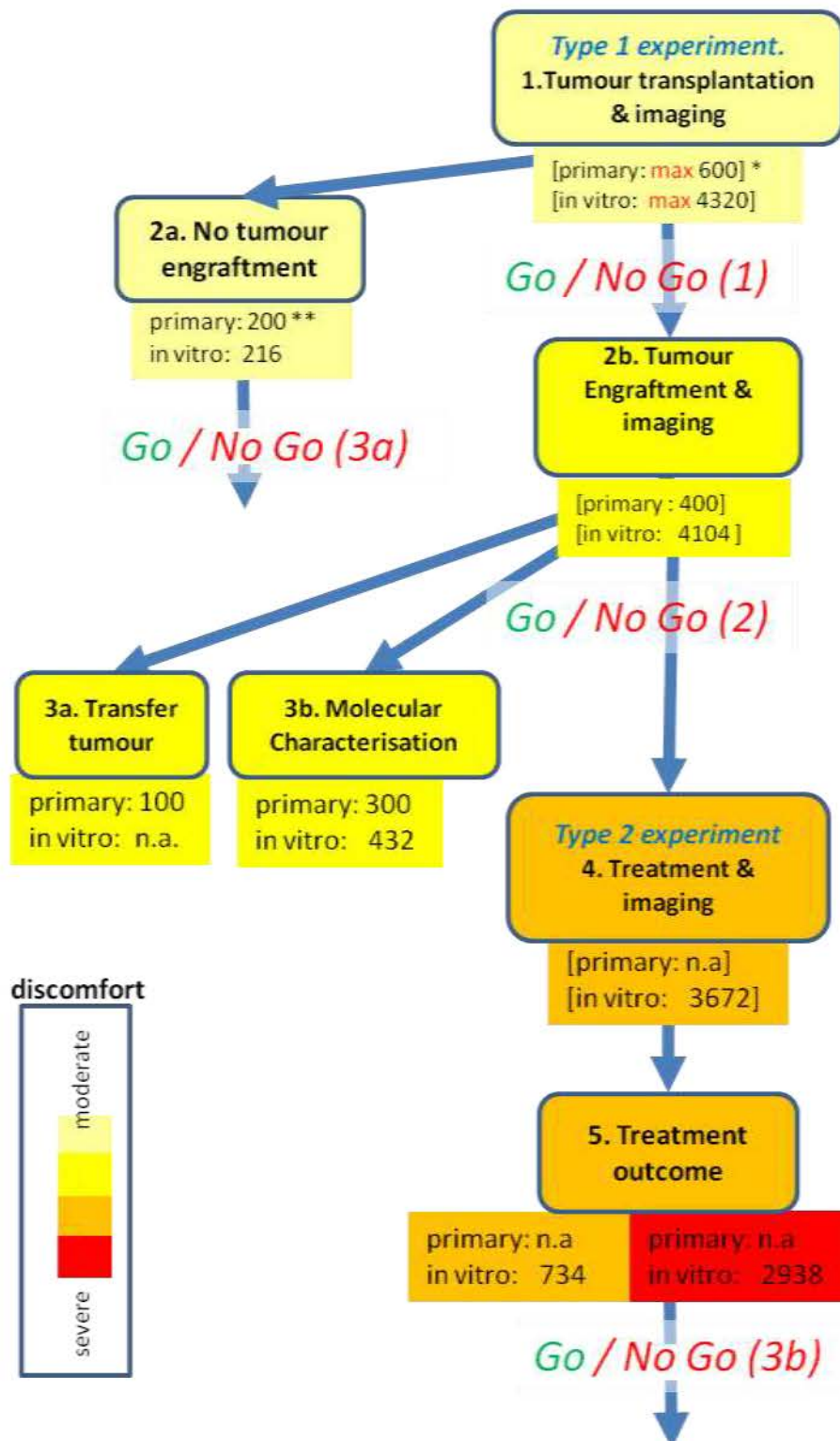


Figure 2: Flow chart of the project Brain tumour cells are either obtained directly from a patient (primary) or are cultured *in vitro*. The expected maximum number of mice for each experimental phase is depicted. Expected severity in each experimental phase is colour coded where red indicates severe discomfort and yellow to orange moderate

discomfort. In type 1 animal experiments; the cells will be injected into the mouse. Dependent on tumour engraftment, a 'Go/No Go' decision is being made (1). For primary tumours, we expect a tumour engraftment of 66%, for *in vitro* cultured cells we expect engraftment 95% of injected mice. For mice with tumour engraftment a second 'Go/No Go' decision is made (2) where mice are either killed (3a + 3b) or included in a treatment study (4). If mice are killed at this 'Go/No Go' point; tumours are collected, processed and the resulting *in vitro* cell lines are transferred to new recipient mice (3b. Transfer tumour), or the tumours are molecularly characterized (3b). For the imaging of tumours, several imaging tools are available. A decision tree to choose the most appropriate imaging tools is given in the appendices. Type 2 experiments involve the treatment of tumour bearing mice. Mice are treated (4) based on the pharmacokinetic properties of the treatment as depicted in the decision tree in appendix 2. We expect that in 20% of the treated mice tumour progression will be significantly inhibited resulting in moderate/severe discomfort and in 80% of the treated mice discomfort will be severe. Based on the engraftment or treatment outcome there are 'Go/No Go' decision points (3a and 3b) where it is decided if the experimental procedure has to be repeated with altered experimental parameters. This decision to repeat the experiment will always be made after consulting the IvD. Tumour progression will be monitored by the appropriate imaging tools as depicted in the decision trees in both appendices.

References

- Inda, M. et al., 2010. Tumour heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. , pp.1731–1745.
- Louis, D.N. et al., 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114(2), pp.97–109.
- Louis, D.N. et al., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), pp.803–20.
- Mueller, S. & Chang, S., 2009. Pediatric brain tumours: current treatment strategies and future therapeutic approaches. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 6(3), pp.570–86.
- Northcott, P.A. et al., 2012. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature*, 488(7409), pp.49–56.
- Packer, R.J. et al., 2013. Survival and secondary tumours in children with medulloblastoma receiving radiotherapy and adjuvant chemotherapy: results of Children's Oncology Group trial A9961. *Neuro-oncology*, 15(1), pp.97–103.
- Taylor, M.D. et al., 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta Neuropathologica*, 123(4), pp.465–472.
- Woehrer, A., Bauchet, L. & Barnholtz-Sloan, J.S., 2014. Glioblastoma survival: has it improved? Evidence from population-based studies. *Current opinion in neurology*, 27(6), pp.666–74.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Protocol for brain tumour transplantation
2	Protocol for treatment of brain tumours
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	VUmc	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 01	Type of animal procedure Protocol for brain tumour transplantation

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This appendix describes the protocol for development of brain tumour models. The brain tumours are induced by transplantation of tumour material or cells to mice. This tumour material can be either of mouse origin (for syngeneic tumour models) or from human origin (for xenograft transplantation models). Tumour cells can be obtained either from primary tumour material derived during surgical removal of the tumour, from biopsy or autopsy or from cells which were cultured previously in the lab. We describe the use of mice in which a cell line or tumour suspension or a tumour piece is either ectopically or orthotopically injected/implanted. The selection of tumour cells will be based on clinical relevance and expression of specific markers. The use of primary tumour material (e.g. directly obtained from a patient) is necessary to obtain new models of tumours which could not be studied before. Transplantation of cell lines will in general result in reproducible and robust tumour engraftment and growth. The primary outcome parameters will be based on tumour progression (as monitored visually, by imaging or diagnostics) or survival (humane endpoints). Furthermore biological effects will be determined in blood or relevant tissues after resection and/or collection of these materials.

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

Tumour cells will be transplanted mainly orthotopical (e.g. in the same location where the tumour grows in humans) into the brain of mice. This approach of intracranial injections of brain tumour cells is relevant because this is the location where these tumours normally grow and therefore necessary to make comparisons with the human situation. Alternatively, for expansion of cells with special growth

characteristics or to study the effect of (the lack of) the blood-brain-barrier, tumours will be transplanted by subcutaneous (s.c.) injection of cells or by s.c. implantation of a tumour piece (ectopic transplantation). We expect to inject 95% of the tumours intracranial and only 5% of the tumours s.c. The tumour progression will be monitored with appropriate imaging techniques. Animal wellbeing will be monitored closely by observing animal behaviour and body weight.

All tumour transplantation procedures will be performed under appropriate analgesia and anaesthesia. The discomfort of the injection/transplantation procedures will be moderate, mainly due to recovery from anaesthesia.

The time of follow up of the tumour progression in the research animals will be dependent on the tumour cells themselves. For primary cell lines it is known that tumour progression can take more than one year, whereas for most established cell lines tumour progression is observed in weeks or months. The discomfort due to tumour growth can be severe when grown to a size that humane endpoints are reached (loss of body weight >20%, abnormal posture, inactivity, neurological deficits, etc.). Because symptoms related to brain tumour progression can develop quickly (even within one day) it is not possible to completely prevent severe discomfort in these brain tumour models.

Due to their location within the skull, brain tumours cannot be studied visually or by palpation. Therefore, more advanced imaging techniques are required to be able to study the biology, progression and response to therapy of brain tumours (Figure 1). We hereby provide short descriptions of relevant preclinical imaging techniques that are available at our institution. These techniques have been extensively validated at our institute and we have substantial experience in their application. Although the imaging itself can be considered non-invasive, it will -as indicated below- often require administration of a sedative, anaesthesia and/or contrast agent, thereby rendering it minimally invasive. For the more invasive imaging techniques, surgical procedures will be performed under appropriate anaesthesia and analgesia techniques, comparable with the ones used during tumour implantation. The duration of anaesthesia is dependent on the specific imaging technique and may last anywhere from 1 minute (for basic bioluminescence imaging) to 6 hours (for highly detailed intravital microscopy). During lengthy imaging procedures (>5 minutes), precautions will be taken to prevent dehydration and hypothermia of the mice.

The described imaging techniques provide either anatomical information, such as tumour size and growth pattern of the tumour, or functional information. The latter may consist of information on metabolism, electrical nerve activity, blood flow, or chemical composition of areas of tumour involvement. Based on the research question, the most optimal imaging technique will be selected. Additionally, combination of 2 or more of these techniques may reveal important pharmacokinetic information, such as tumour uptake of a certain drug or presence of a certain therapeutic target. These measurements are all vital parts of our quest to understand and eventually treat brain tumours. Our facility and experience give us the unique opportunity to study these phenomena in relevant *in vivo* brain tumour models.

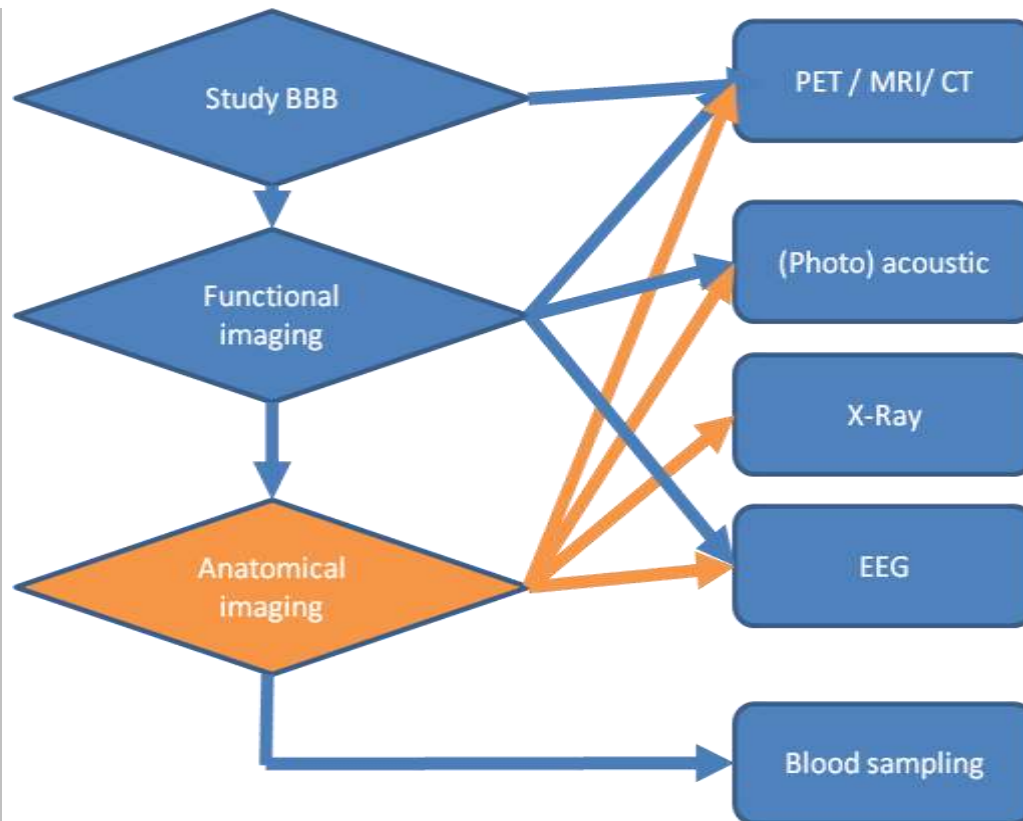


Figure 1. Decision tree for the selection of imaging techniques. For pre-clinical imaging of primary brain tumours, a wide variety of imaging techniques is available. For each experiment the selection of imaging technique will be based on the research question and used brain cancer cells. All techniques, typical imaging times and discomfort are described elsewhere in this document.

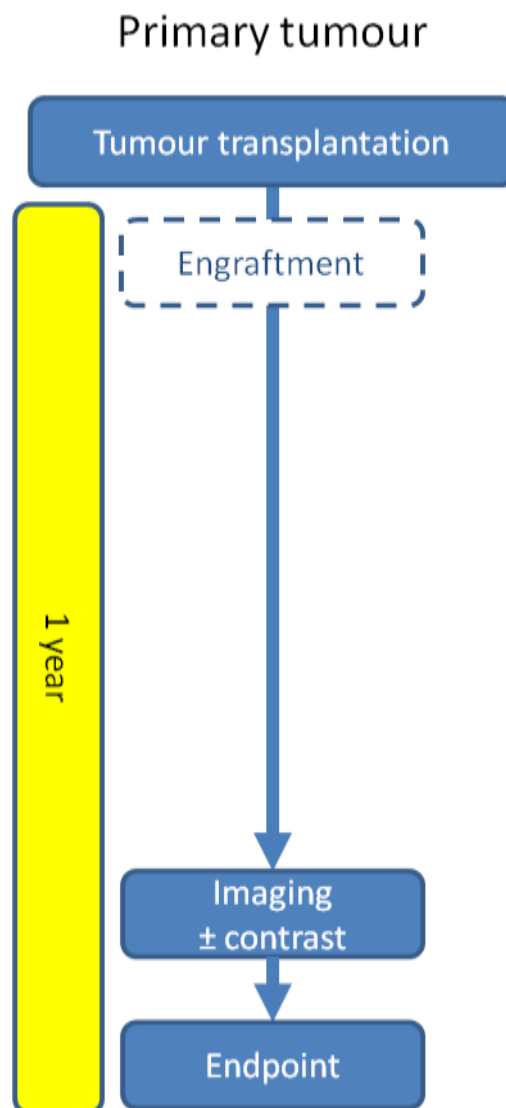


Figure 2: Example of a primary tumour model experiment.

A primary tumour is transplanted. Whenever the animal develops symptoms which indicate progressive disease, an MRI is performed with contrast enhancement to visualize the tumour and the BBB integrity. The time between tumour transplantation and endpoint is typically around one year. Imaging techniques, such as MRI, are applied at the end of the experimental period, when the first animals develop signs of tumor progression such as gradual weight loss. BBB=Blood Brain Barrier, MRI=Magnetic Resonance Imaging

Minimally invasive techniques

MRI: Magnetic Resonance Imaging (MRI) makes use of strong magnetic fields and radiowaves to create images of organs and tissues. When combined with the use of contrast agents, this technique can be used for both anatomical and functional imaging. MRI is performed under isoflurane inhalation anaesthesia; typical imaging time is 1-2 hours. The MRI is painless, discomfort due to anaesthesia and i.v. injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated up to 2x per week.

X-ray: X-rays are a form of electromagnetic radiation. Because different tissues have a different absorption of this type of radiation, X-rays can be used to visualize the insides of a body without making incisions. This will mainly provide anatomical information. Contrast agents may be used to visualize specific aspects of the tissue and provide more functional information. X-ray imaging is performed under isoflurane inhalation anaesthesia, typical imaging time is <5 minutes. Discomfort due to anaesthesia and injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated 2 to 3 times per week.

CT: Computerized Tomography (CT) scans combine a range of X-rays, taken at different angles, to obtain 3-dimensional anatomical information. With the use of contrast agents functional information, such as blood perfusion of an organ, can also be obtained. This procedure is performed under isoflurane anaesthesia, typical imaging time is <20 minutes. Discomfort due to anaesthesia and injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated 2 to 3 times per week

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] Typical imaging time is <1 hour . The procedure can be repeated 2 times per week.

Fluorescence imaging: Fluorescent signals present in tumour cells, or produced after administration of so-called fluorophores, can be visualized by exposing the animal to a beam of light of a specific wavelength, after which sensitive cameras register the emitted light at a different wavelength. This can provide both anatomical and functional data, dependent on the specific system and fluorophores used. This imaging is done under isoflurane inhalation anaesthesia. Typical imaging time is <5 minutes. This procedure can be repeated 2 to 3 times per week. The anaesthesia will result in moderate discomfort.

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] . These techniques are performed under isoflurane anaesthesia. The discomfort is moderate due to anaesthesia and injection of contrast agents. Typical imaging times are 1-2 hours. This procedure can be repeated up to 2 times per week.

Others:

Blood sampling: Nowadays, much attention in the scientific community is directed towards minimally invasive detection of tumours to facilitate early diagnosis and monitoring of tumour progression and/or response to therapy. By studying components of peripheral blood, like cells, proteins and circulating DNA/RNA, we can gather important information on tumour biology and development. This will mainly give functional information, but will also enable us to develop these techniques for future clinical use in relevant mouse models. For collection of blood we will adhere to the guidelines as presented in "A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Tox 2001; 12-23". Blood is collected with a frequency and following a method that does not exceed mild discomfort.

Ex vivo histology: Tissues will be obtained at the end of the experiments, after killing the animal, to enable histological analysis. In some occasions it is necessary to perfuse animals with special fixatives to preserve the morphology and protein expression of tissues. For this purpose, animals will be subjected to overdose sedation and anaesthesia after which fixatives are administered through transcatheterial perfusion, resulting in the death of the animal. The subsequent *ex vivo* histological studies will provide both important anatomical and functional information.

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

Our research group has ample experience with the kind of experiments as described in this protocol. Based on this we expect a tumour take rate of primary tumours of approximately 66% (based on historical data).

If we inject 6 mice with primary tissue, we may expect a minimum of 3 of them to develop a tumour. Each newly developed tumour will be transplanted to 3 new mice to confirm and maintain the tumour growth.

This results in a group size of 15 mice per primary tumour.

B. The animals

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

Species: Mouse (*Mus musculus*)

Age at study start: 4 weeks to 6 months

Origin: commercial breeder or institutional breeding facility

Gender: Both male or female mice can be used. Per experimental series just one gender will be selected.

Estimated numbers (see also Figure 2 of the project proposal):

We expect to transplant the following number of mice:

For primary cell lines:

8 primary tumours per year, resulting in $8 \times 15 = 120$ animals per year (600 in 5 years)

Expected discomfort (based on 66% uptake rate in the initial tumour transplantation); 40 animals/year moderate (200 in 5 years), 80 animals/year severe (400 in 5 years)

Go/No Go: If no tumour develops, the tumour transplantation will be repeated one more time (in 6 mice) if possible. If this again did not result in tumour progression, we won't continue with this cell line/tumour source. Before the experiment is repeated, we will discuss the experimental outcome with the IvD.

Justification: Mice are the most frequently used animal models in oncology research. We have broad experience with these mice models. Much information is available with respect to available tumour models, cell lines and xenografts that are transplantable to mice. Moreover, for mice many specific reagents are available. Many of the imaging modalities, such as preclinical ██████ MRI and BLI are specially designed for optimal use with mice.

For xenograft models we will use immunocompromised mice, for syngeneic models we will use immunocompetent mice of strains with the appropriate background. Precise strains will be communicated before start of the experiment with the IvD. This strain selection depends on the requirements of the model and the tolerance of the strain for certain therapeutic interventions.

In general, we will use mice of young age (4 - 8 weeks at start of study). However, for autopsy studies we need to order mice as soon as the paediatric patient reaches a bad condition. If the patient then recovers and the procedure is postponed, the animals can be used up to an age of 6 months.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Where applicable we will study, prior to the *in vivo* studies, cell culture experiments and other evaluations to test the proposed concepts for intervention. However, since cancer is a complex disease in which there is interaction between the tumour environment and the tumour cells, these cell cultures are not sufficient to draw conclusions about treatment efficacy. Furthermore, *in vitro* studies do not take the effects of the blood-brain-barrier into account. Therefore we need *in vivo* experiments to study the treatment of this complex disease *in vivo*.

Reduction: The number of animals per study arm is based on our experience with these models and in line with generally accepted protocols. With respect to the development of primary tumours, reduction of the number of animals reduces the chance to get a valuable model from the patient, especially when it concerns an autopsy of a paediatric patient. Further reduction of the number of animals per treatment arm will have a severe adverse effect on the statistical power of the study.

Refinement: Unfortunately every successful induction of a brain tumour will result in severe discomfort. We try to keep this discomfort as low as possible by using appropriate analgesia and anaesthesia and strict humane endpoints.

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

To minimize animal suffering we will use appropriate analgesia and anaesthesia during and after surgical interventions and during imaging. Animals will be closely monitored during disease progression. We will adhere to the Code of Practice of handling lab animals in oncology.

Adverse effects on the environment are minimal with this setup. All waste will be disposed conform legal and institutional regulations.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The focus of our research group is on neuro-oncology. We follow literature as closely as possible and are participating in international scientific meetings. Thus, we are well aware of what is going on in the brain cancer research field. To prevent duplication of research at our institute, we centralize all brain tumour research via the [REDACTED].

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Local and/or systemic analgesia, inhalation and/or injection anaesthesia.
Procedures will be communicated with and approved by the IvD before start of the experiments.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Individual housing of animals could be expected in some occasions.

Explain why these effects may emerge.

Individual housing of animals may be needed to prevent fighting (male animals) or when the other mice within a cage have reached the endpoints

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

If possible animals will be housed group wise at young age to prevent fighting

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The animals might reach severe humane endpoints as described in the Code of Practice of lab animals in oncology, in line with international regulations (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102; 1555-1577).

The severe endpoints cannot always be prevented because of the nature of brain tumor development. Clinical signs are often recognized only after advanced tumor progression. This tumor progression results in severe discomfort such as neurological symptoms or inactivity of the animal at which point the animal is killed within one day.

For our models the criteria for humane endpoints are:

Weight loss of more than 20% of the initial body weight.

A tumour mass more than 10% of the body weight (for s.c. tumours)

Severe abnormal behavior, like inactivity, of the animal.

Severe neurological symptoms like epileptic seizures or limping.

Indicate the likely incidence.

We expect that 66% of the mice will develop a tumour; 50% of the mice with a developed tumour will reach the severe humane endpoints.

K. Classification of severity of procedures

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

Disease related	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no/ week)	% of mice
Presence of tumor				
Subcutaneous (s.c.) tumor	mild	<2 years	n.a.	1
Intracranial (i.c.) tumor	mild	<2 years	n.a.	66
Progressed tumor (at humane endpoint)				
Subcutaneous (s.c.) tumor	moderate	< 2 days	n.a.	1
Intracranial (i.c.) tumor	severe	< 2 days	n.a.	32

Actions without anaesthesia	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no./week)	% of mice
General				
Observation + Handling	mild	<2 min	7	100
Internal transport	moderate	<10 min	5	50
Solitary housing	moderate	*	n.a.	1
Quantification methods				
Caliper measurement	mild	<2 min	5	1
Weighing	mild	<2 min	7	100
Administration routes				
Subcutaneous (s.c.)	moderate	<2 min	14	99
Intraperitoneal (i.p.)	moderate	<2 min	14	20
Intravenous (i.v.)	moderate	<2 min	14	50
Oral gavage (p.o.)	moderate	<2 min	14	20
Blood withdrawal				
Vein cut	moderate	<2 min	**	30
Sublingual	moderate	<2 min	**	5

*Solitary housing will be avoided as much as possible, however when mice are fighting or 2 days directly after cranial window procedure this solitary housing is needed. Solitary housing may also be applicable when other mice of the cage were killed and re-arrangement of mice will affect the experiment.

**Based on maximal sampling volumes.

Actions with anaesthesia	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no./week)	% of mice
General				
Anaesthesia	moderate	<5 min	5 ***	99
Tumor induction				
Intracranial (i.c.) tumor injection	mild	<10 min	1	97
Subcutaneous (s.c.) tumor injection	mild	<2 min	1	1
Intravenous (i.v.) tumor injection	mild	<2 min	1	2
Imaging/quantification methods				
██████████	mild	<2 hours	2	10
CT-scan	mild	<2 hours	2	10
MRI-scan	mild	<2 hours	2	50
X-ray	mild	<2 hours	2	10
Fluorescence imaging	mild	<10 min	3	5
Blood withdrawal				
Vein cut	mild	<2 min	**	10
Sublingual	mild	<2 min	**	20
Orbital puncture	mild	<2 min	**	10
Heart puncture (endpoint)	mild	<2 min	n.a.	50
Methods of killing				
Killing under anaesthesia (conform guideline)	non-recovery		n.a.	80
Killing without anaesthesia (conform guideline)	non-recovery		n.a.	20

Cumulative discomfort	% of mice
Moderate	34
Severe	66

***The maximum number of repetitions for recovery from anaesthesia is 5 times per week. On average: the anaesthesia will be provided 2-3x per week, with a maximum number of 15x during a complete experiment that may last several weeks.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

To obtain tissues for analysis.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	VUmc	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		02	Protocol for treatment of brain tumours.

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This appendix describes the induction of brain tumour models by transplantedation of brain tumour material or cells to mice. We describe the use of mice in which a cell line or tumour suspension or a tumour piece is ectopically or orthotopically injected/implanted.

The mice with the induced tumours will be treated by the investigational treatment and tumour progression will be monitored by appropriate techniques. The primary outcome parameters will be based on tumour progression (visual or by imaging) or survival (humane endpoints). Furthermore biological effects will be determined in blood, or relevant tissues after resection

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

Tumour cells will be transplanted as described in appendix 1.

The time of start of treatment will be dependent on the tumour cells used in the specific experiment. In general the treatments will be started after engraftment. For most cell lines, tumour engraftment is within two weeks, however for some tumours the engraftment may take 1-2 months. The discomfort due to tumour growth can be severe when grown to a size that humane endpoints are reached (loss of body weight >20%, abnormal posture, inactivity, neurological deficits, etc.). Due to the relatively rapid tumour growth in short time we monitor the animals closely to avoid severe discomfort as much as possible.

Treatment may involve any kind of agent, including chemicals, biologicals, cells, genetic vectors, viruses, radiation or vaccines, surgical removal of the tumour and/or combinations of those interventions. In the

case the novel treatments are directed against specific biological targets, the cell lines used for tumour transplantation will be selected based on the availability of the target. New treatments are identified by *in silico* and *in vitro* analyses. This is done by the use of several laboratory techniques, including RNA sequencing and screening of drug-libraries on the cell lines, but also literature studies, or *in silico* analyses. Moreover, collaborations with our national and international research partners will give us new leads to identify novel therapeutics. These newly identified therapeutics can be tested as single agents or in combination with one another to improve anti-tumour efficacy in the heterogeneous brain tumours. *In vitro* tests are also used to predict toxicity in order to limit unwanted side effects, morbidity and mortality. In order to translate the laboratory findings to clinical trials, we will establish the safety and efficacy of (combinations of) compounds in the appropriate animal models. Additionally, new strategies and applications to circumvent or modify the blood-brain barrier, such as CED or [REDACTED], will be developed and tested, either alone or in combination with aforementioned compounds, to improve drug delivery to the site of the tumour. Administration might be systemic (such as i.v./i.p./p.o./s.c/i.d.) or local via intratumoural injection, CED or minipumps (Figure 1). The administration route, dose and frequency will depend on the target of the intervention and will be based on known and/or expected biodistribution and pharmacokinetics. If administration requires surgical procedures, these will be performed under appropriate analgesia and anaesthesia. Discomfort will be moderate for these administration routes. For other administration routes, discomfort will be mild. Details of each treatment in a study will be discussed with the IvD before start of the experiments.

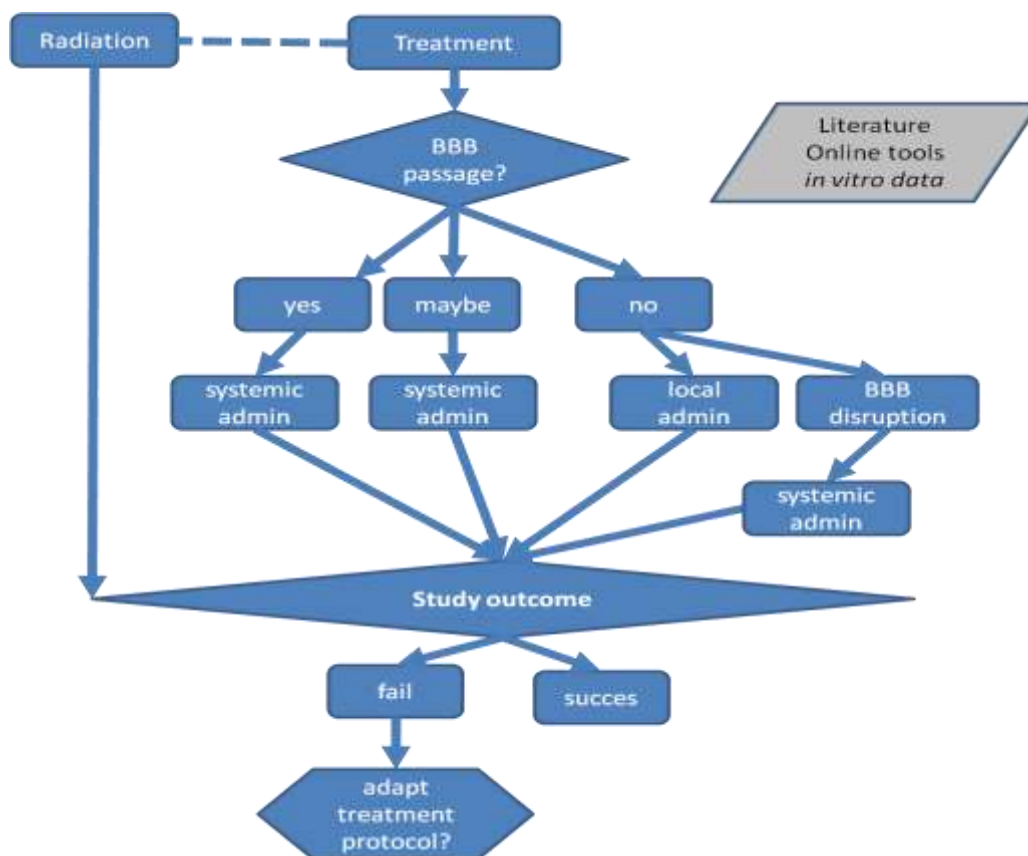


Figure 1: Decision tree for the selection of the route of administration. For each treatment, the optimal administration route will be selected *a priori*. Selection of the administration route is based on the capability to pass the BBB and on the pharmacokinetics of the compound. For effective treatment, the compounds have to pass the BBB. This capability to pass the BBB can be predicted with online tools, which are based on the chemical structure of the compound, or with *in vitro* assays. Whenever this BBB passage is unknown, the first line of treatment is by systemic administration. Local administration can be intratumoural injection or convection-enhanced delivery, or via minipumps. Other methods to bypass the BBB are by BBB disruption, either chemically (with cytokines or high osmolarity) or [REDACTED]. BBB=Blood Brain Barrier.

Due to their location within the skull, brain tumours cannot be studied visually, by palpation or by direct measurement. Therefore, more advanced imaging techniques are required to be able to study the biology, progression and response to therapy of brain tumours. We hereby provide short descriptions of the preclinical imaging techniques that are available for brain tumour imaging. These techniques have all been extensively validated and we have substantial experience in applying them.

Although the imaging itself can be considered non-invasive, it will often require administration of a sedative, anaesthesia and/or contrast agent, thereby rendering it minimally invasive. For the more invasive imaging techniques, surgical procedures will be performed under appropriate anaesthesia and analgesia, comparable with the ones used during tumour implantation. The duration of anaesthesia is dependent on the specific technique applied and may last anywhere from 1 minute (for basic bioluminescence imaging) to 6 hours (for highly detailed intravital microscopy).

During lengthy imaging procedures (>2 minutes), precautions will be taken to prevent dehydration and hypothermia of the mice.

The described techniques provide either anatomical information, such as tumour size and growth pattern and influence on the tumour (micro-)environment, or functional information. The latter may consist of information on metabolism, electrical nerve activity, blood flow, or chemical composition of areas of tumour involvement. Based on the research question, the most optimal imaging technique will be selected. Additionally, combination of 2 or more of these techniques may reveal important pharmacokinetic information, such as tumour uptake of a certain drug or presence of a certain therapeutic target. These measurements are all vital parts of our quest to understand and eventually treat brain tumours. Our facility and experience give us the unique opportunity to study these phenomena in relevant *in vivo* brain tumour models.

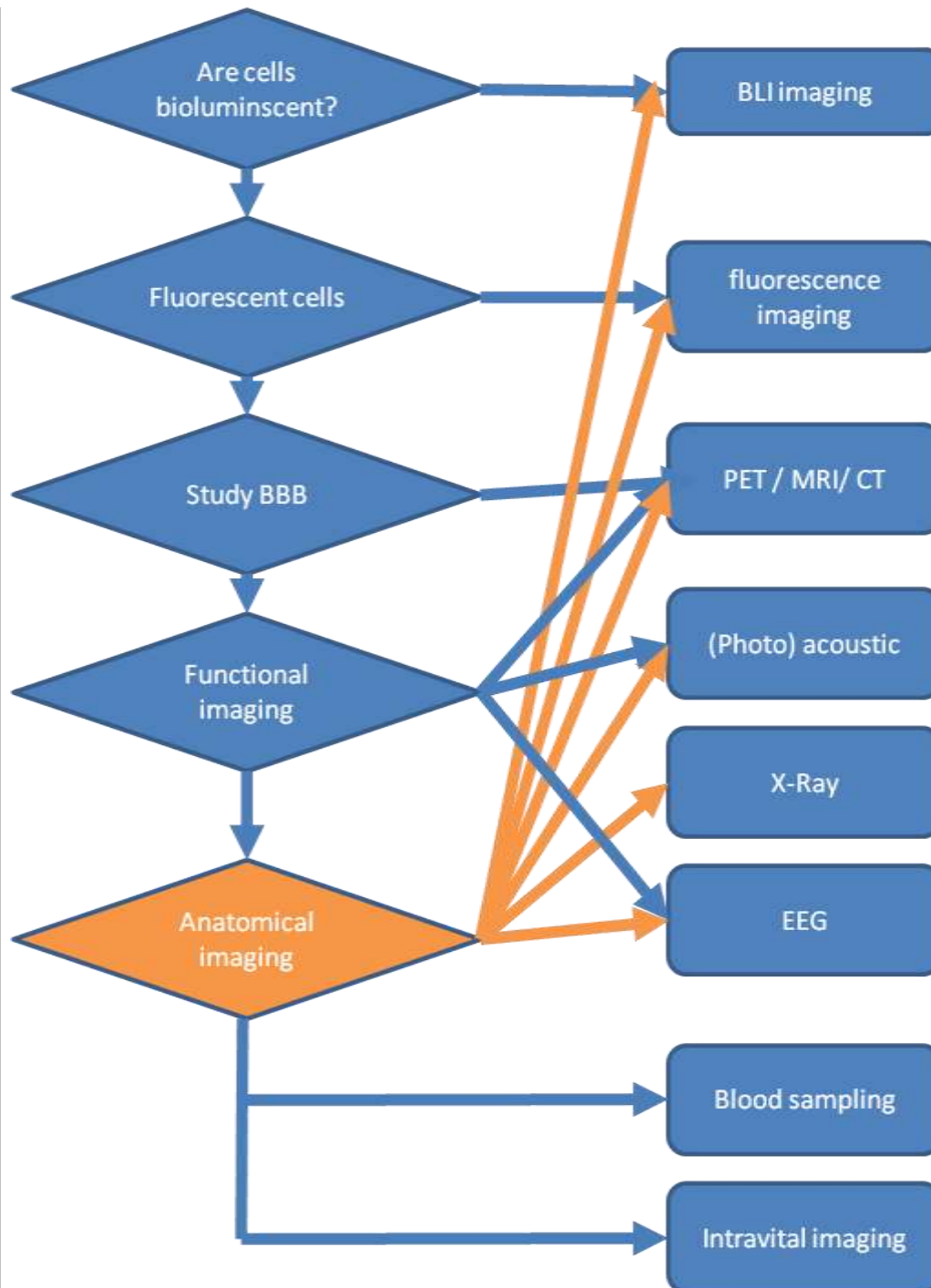


Figure 2. Decision tree for the selection of imaging techniques. For pre-clinical imaging of brain tumours, a wide variety of imaging techniques is available. Many of these are often used together (dotted lines) For each experiment the selection of imaging techniques will be based on the research question and used brain cancer model. All techniques, typical imaging times and discomfort are described elsewhere in this document. NB In typical experimental settings, 2 to 3 imaging techniques are applied (see Figure 3). It will **never** happen that all imaging techniques are being applied to one animal.

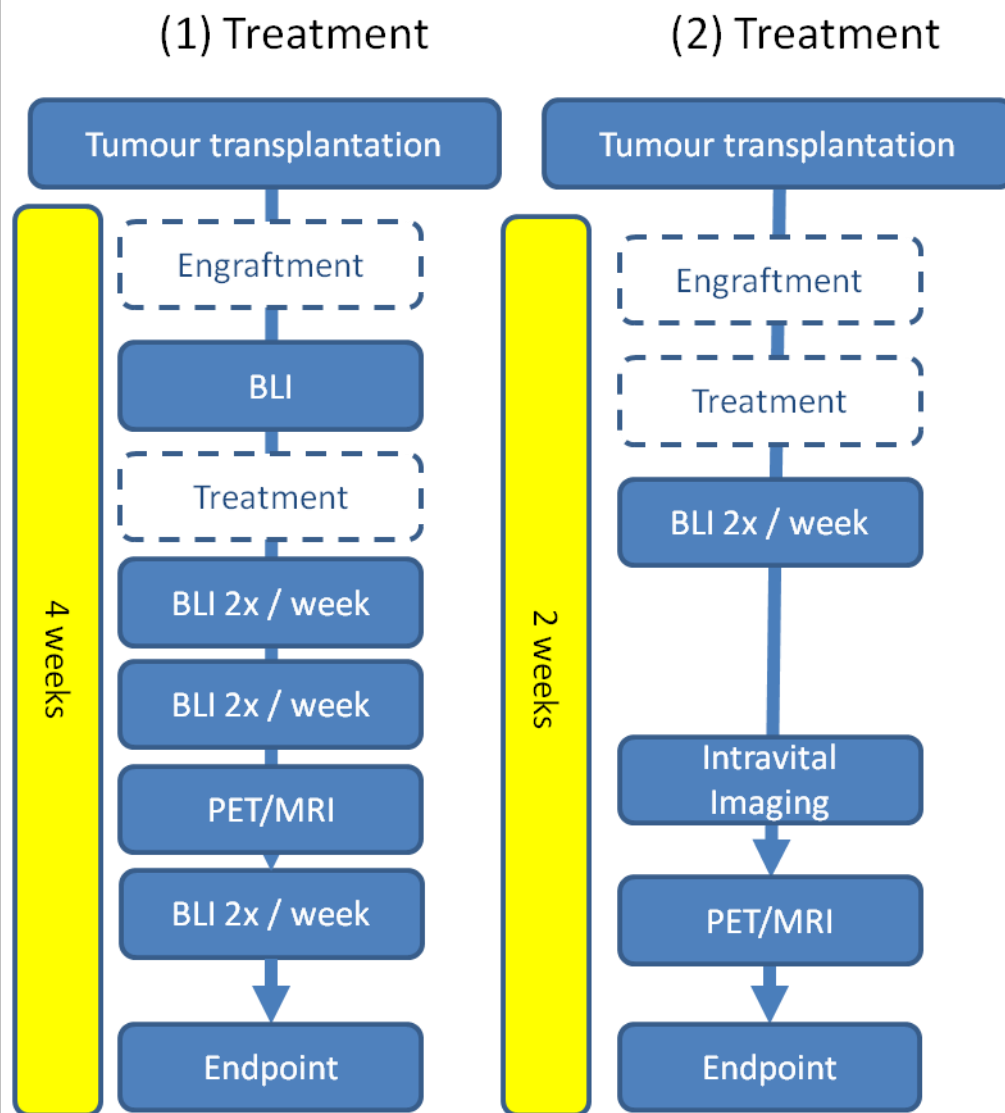


Figure 3: Two examples of study designs for the treatment and imaging of brain tumours.

(1) Standard treatment study: Tumour cells are transplanted; after one week BLI is measured and the mice are stratified into their treatment arms and treatment is started. Tumour growth is monitored by BLI imaging (twice per week); when the tumours (in the untreated control group) have progressed, a [REDACTED] is performed to get functional information. BLI imaging is continued until the determined endpoints. Typically, the time between tumour transplantation and endpoint is around 4 weeks (for the untreated control group).

(2) More complicated study design in which we want to see the influence of treatment on tumour development. In such an occasion, treatment is started shortly after tumour transplantation, BLI used to confirm tumour development and progression, followed by intravital imaging to see interactions of the tumour cells with their micro-environment and finally [REDACTED] imaging to validate the presence of specific targets.

On average, the anaesthesia will be applied up to 2-3x per week, with a maximum number of 15x during a complete experiment that may last several weeks. BBB=Blood Brain Barrier, BLI=Bioluminescence Imaging, [REDACTED] MRI=Magnetic Resonance Imaging

Minimally invasive techniques

MRI: Magnetic Resonance Imaging (MRI) makes use of strong magnetic fields and radiowaves to create images of organs and tissues. When combined with the use of contrast agents, this technique can be used for both anatomical and functional imaging. MRI is performed under isoflurane inhalation anaesthesia, typical imaging time is 1-2 hours. The MRI is painless, discomfort due to anaesthesia and i.v. injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated up to 2x per week.

X-ray: X-rays are a form of electromagnetic radiation. Because different tissues have a different absorption of this type of radiation, X-rays can be used to visualize the insides of a body without making incisions. This will mainly provide anatomical information. Contrast agents may be used to visualize specific aspects of the tissue and provide more functional information. X-ray imaging is performed under isoflurane inhalation anaesthesia, typical imaging time is <5 minutes. Discomfort due to anaesthesia and injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated 2 to 3 times per week.

CT: Computerized Tomography (CT) scans combine a range of X-rays, taken at different angles, to obtain 3-dimensional anatomical information. With the use of contrast agents functional information, such as blood perfusion of an organ, can also be obtained. This procedure is performed under isoflurane anaesthesia, typical imaging time is <20 minutes. Discomfort due to anaesthesia and injection of contrast agents is moderate. This procedure can be repeated up to 2 to 3 times per week

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] Typical imaging time is <1 hour . The procedure can be repeated up to 2 times per week.

BLI: Bioluminescence imaging (BLI), is the imaging of light produced in living animals. Tumour cells can be modified to produce enzymes like Gaussia or Firefly luciferase, which metabolize a specific substrate, administered during the procedure, to produce light. The localization and concentration of these enzymes can be determined by sensitive cameras after injection of their specific substrates. The intensity of the light produced is a reliable measure of tumour size. BLI imaging is performed under isoflurane anaesthesia. Typical imaging time is <5 minutes. The procedure can be repeated up to 2 to 3 times per week. Discomfort is moderate due to anaesthesia and injection of the substrate.

Fluorescence imaging: Fluorescent signals present in tumour cells, or produced after administration of so-called fluorophores, can be visualized by exposing the animal to a beam of light of a specific wavelength, after which sensitive cameras register the emitted light at a different wavelength. This can provide both anatomical and functional data, depending on the specific system and fluorophores used. This imaging is done under isoflurane inhalation anaesthesia. Typical imaging time is <5 minutes. This procedure can be repeated up to 2 to 3 times per week. The anaesthesia will result in moderate discomfort.

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] Typical imaging times are 1-2 hours. This procedure can be repeated up to 2 times per week.

Invasive imaging techniques

EEG: Electroencephalography (EEG) is a method to study the electrical activity of the brain. Brain cells communicate with each other through electrical impulses. Brain tumour progression will alter the pattern of these electrical impulses and, reciprocally, this altered electrical activity will influence tumour growth and biology. For preclinical research, the implantation of electrodes into the brain is needed to register the EEG signals. This technique will mainly provide functional information, although state-of-the-art software is capable of generating anatomical information from EEG patterns as well.

All surgical procedures are performed under appropriate analgesia and anaesthesia. Discomfort is

moderate. The EEG measurement is performed on awake animals, discomfort of the measurement is moderate. Measurement can be repeated 2 to 3 times per week.

Intravital microscopy: With the use of dedicated confocal or multiphoton microscopes, microscopic images within tissues of living organisms can be made. For many applications, including brain research, it is necessary to apply a window through which the images can be obtained. This technique will give both functional and anatomical information. All surgical procedures to create a window are performed under appropriate analgesia and anaesthesia. Discomfort of the surgical procedure is moderate. Intravital imaging is performed under isoflurane anaesthesia. Discomfort of these measurements is moderate. The measurements can be repeated up to 2 to 3 times per week.

Others:

Blood sampling: Nowadays, much attention in the scientific community is directed towards minimally invasive detection of tumours to facilitate early diagnosis and monitoring of tumour progression and/or response to therapy. By studying components of peripheral blood, like cells, proteins and circulating DNA/RNA, we can gather important information on tumour biology and development. This will mainly give functional information, but will also enable us to develop these techniques for future clinical use in relevant mouse models. For collection of blood we will adhere to the guidelines as presented in "A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Tox 2001; 12-23". Blood is collected with a frequency and following a method that does not exceed mild discomfort.

Ex vivo histology: Tissues will be obtained at the end of the experiments, after killing the animal, to enable histological analysis. In some occasions it is necessary to perfuse animals with special fixatives to preserve the morphology and protein expression of tissues. For this purpose, animals will be subjected to overdose sedation and anaesthesia after which fixatives are administered through transcardial perfusion, resulting in the death of the animal. The subsequent *ex vivo* histological studies will provide both important anatomical and functional information.

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

With the therapeutic intervention studies, we consider an effect of 50% improvement in terms of tumour growth or survival between groups as relevant. To minimize the variation between groups, we will stratify the mice based on the tumour size (as measured by imaging or caliper measurement) before start of the treatments. If this stratification is not possible, mice will be randomized. In general we have a relative standard deviation around 30%. With a power of 0.9 and an alpha of 0.05 group size should be 7 animals per group. However, when we want to test multiple treatment groups we need to correct the alpha value. For an average experiment with 6 treatment arms, the alpha value will be $0.05 / (6-1) = 0.01$. This results in a group size of 10 evaluable mice when performing a 6-arm study group. We anticipate that 15% of the mice are not used to evaluate treatment efficacy either because of lack of tumour development (5% of the mice) or because mice are used for molecular characterization (10% of the mice).

This results in a group size of 12 animals per study arm, thus $6 \times 12 = 72$ animals per experiment

B. The animals

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

Species: Mouse (*Mus musculus*)

Age at study start: 4 weeks to 6 months

Origin: commercial breeder or institutional breeding facility

Gender: Both male or female mice can be used. Per experimental series just one gender will be selected.

Estimated numbers (see also Figure 2 of the project proposal):

12 intervention studies per year, resulting in $12 \times 72 = 864$ animals per year (4320 in 5 years).

The expected discomfort is moderate for mice in which there is no tumour engraftment (5% of the

animals, 216 per 5 year), moderate in animals which are used for molecular characterization (10% of the animals, 432 per 5 year). The remaining 3672 animals will enter the actual treatment arms of the type 2 experiments. The discomfort of these treated animals will be moderate for the ones which will be killed before the tumour has progressed to the humane endpoint (20% of type 2 experimental animals; 734 animals in 5 years); the discomfort is severe in severe in all other type 2 experimental mice (2938 animals in 5 years).

Go/No Go: If severe adverse effects of treatment are observed, the treatment will be terminated and together with the IvD we will decide if, and under which conditions, the treatment can be continued.

Justification: Mice are the most frequently used animal models in oncology research. We have broad experience with these mouse models. Much information is available with respect to available tumour models, cell lines and xenografts that are transplantable to mice. Moreover, for mice many specific research reagents are available. Many of the imaging modalities, such as preclinical MRI and BLI are specially designed for optimal use with mice.

For xenograft models we will use immunocompromised mice, for syngeneic models we will use immunocompetent mice of strains with the appropriate background. Precise strains will be communicated before start of the experiment with the IvD. This strain selection depends on the requirements of the model and the tolerance of the strain for certain therapeutic interventions.

In general, we will use mice of young age (4 - 8 weeks at start of study). However, for autopsy studies we need to order mice as soon as the paediatric patient reaches a bad condition. If the patient then recovers and the procedure is postponed, the animals can be used up to an age of 6 months.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Where applicable we will study, prior to the *in vivo* studies, cell culture experiments and other evaluations to test the proposed concepts for intervention. However, since cancer is a complex disease in which there is interaction between the tumour environment and the tumour cells, these cell cultures are not sufficient to draw conclusions about treatment efficacy. Furthermore, *in vitro* studies do not take the effects of the blood-brain-barrier into account. Therefore we need *in vivo* experiments to study the treatment of this complex disease *in vivo*.

Reduction: The number of animals per study arm is based on our experience with these models and in line with generally accepted protocols. With respect to the development of primary tumours, reduction of the number of animals reduces the chance to get a valuable model from the patient. Further reduction of the number of animals per treatment arm in intervention studies will have a severe adverse effect on the statistical power of the study.

Refinement: Unfortunately every successful induction of a brain tumour will result in severe discomfort. We try to keep this discomfort as low as possible by using appropriate analgesia and anaesthesia and strict humane endpoints.

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

To minimize animal suffering we will use appropriate analgesia and anaesthesia during and after surgical interventions and during imaging. Animals will be closely monitored during disease progression. We will adhere to the Code of Practice of handling lab animals in oncology. Adverse effects on the environment are minimal with this setup. All waste will be disposed conform legal and institutional regulations.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The focus of our research group is on neuro-oncology. We follow literature as closely as possible and are participating in international scientific meetings. Thus, we are well aware of what is going on in the brain cancer research field. To prevent duplication of research at our institute, we centralize all brain tumour research via the [REDACTED].

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Local and/or systemic analgesia, inhalation and/or injection anaesthesia. Procedures will be communicated with and approved by the IvD before start of the experiments.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Treatments may cause toxic side effects. Individual housing of animals could be expected in some

occasions.

Explain why these effects may emerge.

Many anticancer drugs have a broad working mechanism; quite often there is an effect on healthy cells as well. Individual housing of animals may be needed to prevent fighting (male animals) or if the mice have a cranial window or an implanted electrode or catheter.

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

Dosing will be based as much as possible on known toxicity and safety data. Nevertheless unforeseen complications may occur. In these cases we will minimize the impact of these implications as much as possible. For example by providing easy access to food and water or adaptation of the protocol (lowering dose/frequency).

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

We will use severe endpoints as described in the Code of Practise of lab animals in oncology, in line with international regulation (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102; 1555-1577).

For our models the criteria are:

Weight loss of more than 20% of the initial body weight.

A tumour mass more than 10% of the body weight (for s.c. tumours)

Severe abnormal behavior like inactivity of the animal.

Severe neurological symptoms like epileptic seizures or limping.

Indicate the likely incidence.

We expect that >85% of the mice will be included in treatment groups. All these animals will develop tumours and therefore reach humane endpoints.

K. Classification of severity of procedures

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

Disease related	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no/ week)	% of mice
Presence of tumor				
Subcutaneous (s.c.) tumor	mild	<2 years	n.a.	1
Intracranial (i.c.) tumor	mild	<2 years	n.a.	95
Progressed tumor (at humane endpoint)				
Subcutaneous (s.c.) tumor	moderate	< 2 days	n.a.	1
Intracranial (i.c.) tumor	severe	< 2 days	n.a.	68

Actions without anaesthesia	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no./week)	% of mice
General				
Observation + Handling	mild	<2 min	7	100
Internal transport	moderate	<10 min	5	50
Solitary housing	moderate	*	n.a.	1
Quantification methods				
Caliper measurement	mild	<2 min	5	1
Weighing	mild	<2 min	7	100
Administration routes				
Subcutaneous (s.c.)	moderate	<2 min	14	99
Intraperitoneal (i.p.)	moderate	<2 min	14	50
Intramuscular (i.m.)	moderate	<2 min	14	5
Intravenous (i.v.)	moderate	<2 min	14	20
Oral gavage (p.o.)	moderate	<2 min	14	20
Blood withdrawal				
Vein cut	moderate	<2 min	**	30
Sublingual	moderate	<2 min	**	5

*Solitary housing will be avoided as much as possible, however when mice are fighting or 2 days directly after cranial window procedure this solitary housing is needed. Solitary housing may also be applicable when other mice of the cage were killed and re-arrangement of mice will affect the experiment.

**Based on maximal sampling volumes.

Actions with anaesthesia	Discomfort	Duration of discomfort	Repetitions (max. no./week)	% of mice
General				
Anaesthesia	moderate	<5 min	5 ***	99
Tumor induction				
Intracranial (i.c) tumor injection	mild	<10 min	1	97
Subcutaneous (s.c.) tumor injection	mild	<2 min	1	1
Intravenous (i.v.) tumor injection	mild	<2 min	1	2
Imaging/quantification methods				
██████████	mild	<2 hours	2	10
CT-scan	mild	<2 hours	2	10
MRI-scan	mild	<2 hours	2	50
X-ray	mild	<2 hours	2	10
Fluorescence imaging	mild	<10 min	3	5
Bioluminescence imaging	mild	<10 min	3	75
Intravital microscopy	mild	<4 hours	2	5
██████████	mild	<2 hours	2	5
Blood withdrawal				
Vein cut	mild	<2 min	**	10
Sublingual	mild	<2 min	**	20
Orbital puncture	mild	<2 min	**	10
Heart puncture (endpoint)	mild	<2 min	n.a.	50
Administration routes				
Intracranial (i.c.) injection	moderate	<10 min	7	5
██████████	moderate	<1 hour	7	10
██████████	mild	<1 hour	7	20
Orbital injection	mild	<2 min	7	
Methods of killing				
Killing under anaesthesia (conform guideline)	non-recovery		n.a.	80
Killing without anaesthesia (conform guideline)	non-recovery		n.a.	20

Cumulative discomfort	% of mice
Moderate	32
Severe	68

***The maximum number of repetitions for recovery from anaesthesia is 5 times per week. On average: the anaesthesia will be provided 2-3x per week, with a maximum number of 15x during a complete experiment that may last several weeks.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

To obtain tissues for analysis.

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

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

Yes



Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl.

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- | | |
|--------------------------------|------------|
| Naam van de portefeuillehouder | [REDACTED] |
| KvK-nummer | 64156338 |
| NVWA deelnemernummer | 11400 |

2 Gegevens gemachtigde

- 2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN) Geef aan welk nummer u invult.
- | | |
|---|------------|
| <input type="checkbox"/> KvK-nummer | [REDACTED] |
| <input checked="" type="checkbox"/> BSN | [REDACTED] |
- 2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?
- | | | |
|--------------------|----------------------|---|
| Naam gemachtigde | [REDACTED] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Adres of postbus | [REDACTED] | |
| Postcode en Plaats | [REDACTED] Amsterdam | |

3 Inhoud machtiging

- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen. Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken? Ja > Ga door naar vraag 4 Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u doen? Een projectvergunning aanvragen Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift. Alle bovenstaande opties

4 Ondertekening

- 4.1 Onderteken het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Naam gemachtigde

[Redacted]

Datum

1 6 - 0 8 - 2 0 1 6

Handtekening
portefeuillehouder
van de instelling

[Redacted]

Handtekening
gemachtigde

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
NVWA nummer 11400
2. Titel van het project:
New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer
3. Titel van de NTS:
Nieuwe therapieën voor de behandeling van hersentumoren
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: *05-10-2016*
 - aanvraag compleet: *05-10-2016*
 - in vergadering besproken: *08-11-2016 en 13-12-2016*
 - anderszins behandeld: *n.v.t.*
 - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - aanpassing aanvraag: *19-12-2016*
 - advies aan CCD: *23-01-2017*
7. Afstemming IvD
 - Datum advies IvD: *05-10-2016*
 - 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: *10-11-2016*
- Strekking gestelde vragen: *Graag ziet de DEC meer uitleg over het doel en waarom men bepaalde stappen zet. De navolgbaarheid en focus van het project missen, dit moet worden aangepast, het moet specifieker. Waar, wanneer en waarom doet men dingen en met welke specifieke tumoren? Er is een duidelijke onderbouwing per experiment nodig. Men moet verantwoording geven voor het aantal dieren en het ongerief bij de dieren.*
- Datum antwoord: *01-12-2016*
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. De aanvraag zal besproken worden tijdens de plenaire vergadering van 13 dec 2016.*

Vraagronde 2

- Datum: 15-12-2016
- Strekking gestelde vragen: *De DEC heeft nog een aantal tekstuele opmerkingen en de layout van de schema's kan beter. Daarnaast mist men nog de onderbouwing van de groepen tumoren en een tekstdeel over het in vitro onderzoek. Hoe selecteert men de treatments? En waar is de keuze voor de toedieningswijze van de treatments op gebaseerd? Graag ziet de DEC ook nog extra onderbouwing bij het ongerief.*
- Datum antwoord: 10-01-2017
- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
- 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. *Is het project 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*

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 hoofddoelstelling 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 bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. *Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod?: n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en translationeel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. *Het directe doel van deze studie is het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren. Om dit doel te bereiken zal men nieuwe diermodellen met*

hersentumoren ontwikkelen en therapeutische opties testen met nieuwe en bestaande hersentumor diermodellen.

Het uiteindelijke doel van de studie is het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren bij patiënten. Hersentumoren, met name de zeer agressieve hersentumoren, zijn zeer slecht te behandelen en een groot deel van deze patiënten overlijdt binnen enkele jaren nadat de ziekte is vastgesteld. Daarom is het van belang dat er meer kennis komt over hoe deze tumoren ontstaan en zich ontwikkelen. Daarbij is het van belang dat de diagnostiek en behandeltherapieën worden verbeterd, zodat men vroegtijdig deze tumoren kan opsporen en behandelen.

Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst 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.

De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op de ontwikkeling van therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten.

De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de ingrepen die ze moeten ondergaan en het feit dat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis over (humane) hersentumoren en tegelijkertijd ontwikkelen van nieuwe diermodellen voor deze tumoren die gebruikt kunnen worden voor het onderzoek naar therapieën voor behandeling. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het ontwikkelen van therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren. Ook mensen met andere tumoren kunnen mogelijk voordeel hebben bij de resultaten van dit onderzoek.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten: *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.

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 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.

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 behandelingen voor patiënten met hersentumoren. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel, gezien de beschrijving van de verschillende subonderdelen van het onderzoek en het beschikbaar komen van patiëntmateriaal.

Welzijn dieren

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

Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.

10. *De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het kan zijn dat de dieren in sommige gevallen individueel worden gehuisvest. Bijvoorbeeld als er sprake is van vechtende mannetjes of na de operatie om te kunnen herstellen.*

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

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

De dieren ondervinden licht ongerief als gevolg van imaging, handelingen, bloedafname, tumorinjecties en doden onder anesthesie. Er wordt matig ongerief als gevolg van het inspuiten/inbrengen van de tumorcellen, bloedafname, anesthesie en transport. Daarnaast kunnen de dieren ook ongerief ondervinden door eventuele bijwerkingen van de therapie.

Bij 68% van de dieren zullen zich gevorderde hersentumoren ontwikkelen, wat ingeschat wordt als ernstig ongerief. Bij de overige 32% van de dieren zullen zich geen gevorderde hersentumoren ontwikkelen en wordt het cumulatieve ongerief ingeschat op matig.

Helaas is het niet mogelijk om het ernstige ongerief bij de dieren altijd te voorkomen, dit komt door de ontwikkeling van de hersentumor. De klinische signalen zijn meestal pas in een laat stadium zichtbaar, als de groeiende (hersen)tumor al vergevorderd is. Wanneer de dieren duidelijke neurologische symptomen of inactiviteit vertonen hebben ze het humane eindpunt bereikt en worden ze gedood, om meer ongerief te voorkomen.

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren operaties ondergaan. Daarnaast zullen de dieren hersentumoren ontwikkelen, wat kan leiden tot neurologische symptomen. Tevens kunnen de dieren in sommige gevallen mogelijk negatieve bijwerkingen ondervinden van de therapie.

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.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. Hierbij zal men de Code of Practice voor kankeronderzoek gebruiken. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht (gewichtsverlies >20%) of gedrag (zoals neurologische symptomen of inactiviteit). Een groot deel van de dieren zal door de ontwikkeling van de tumor de humane eindpunten bereiken.

3V's

14. *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.*

Voordat men met de dierstudies begint zullen er zoveel mogelijk metingen uitgevoerd worden met in vitro experimenten, om te testen of de nieuwe behandelingen werkzaam zijn. Echter, het is niet mogelijk om met de huidige laboratorium experimenten het effect van een nieuwe behandeling betrouwbaar vast te stellen door het complexe samenspel tussen de tumor en zijn omgeving. Omdat deze omgeving (zoals bijvoorbeeld de vorming van bloedvaten, het effect van de bloed-hersen-barrière en effecten van het immuunsysteem en de onderlinge samenhang van tumorcellen) van groot belang is, zullen de aangevraagde dierexperimenten noodzakelijk zijn. Dit onderzoek is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk zonder het gebruik van dierexperimenten.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De onderzoekers kiezen ervoor om muizen te gebruiken, omdat hiervan diermodellen beschikbaar zijn met een beperkt immuunsysteem, waarin men humane tumoren kan laten groeien. Men heeft bovendien veel ervaring met de muis als tumormodel, waardoor er methodes en apparatuur speciaal voor dit type proefdier beschikbaar is en waardoor de data goed te vergelijken is met eerdere resultaten.

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

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Verder worden er moderne beeldvormingstechnieken gebruikt waardoor men de effecten van de behandelingen beter kan vaststellen en minder dieren nodig zijn voor effectiviteitsmetingen.

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 4920 muizen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

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

Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Verder zullen de dieren dagelijks beoordeeld worden en indien het dier het humaan eindpunt bereikt zal het uit de proef worden genomen. Alle experimenten zullen worden uitgevoerd door ervaren en bekwaam personeel.

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: *n.v.t.*

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken.

Zowel vrouwelijke als mannelijke dieren zullen worden gebruikt.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef).

De dieren worden gedood om de hersenen verder te kunnen analyseren.

20. Indien dieren worden gedood, is adoptie of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Dit is niet mogelijk omdat er een post-mortem analyse nodig is om de benodigde data te verkrijgen.

NTS

21. *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 (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

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

Bij deze dierproef is de centrale morele vraag:

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over hersentumoren en daarmee de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren het gebruik van maximaal 4920 muizen in de dierproef die daarvan maximaal ernstig 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 matig tot ernstig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: veel voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De

waarden die voor de patiënten bevorderd worden: veel voordeel omdat de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van nieuwe therapieën voor de behandeling van hersentumoren.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 4920 muizen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor de ontwikkeling van een nieuwe therapeutische behandelingen van hersentumoren 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. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2).

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 therapeutische strategieën voor de behandeling van hersentumoren. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een adequate behandeling van patiënten met hersentumoren, is afgewogen tegen het, als maximaal ernstig 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 4920 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 wetenschappelijk en maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling van hersentumoren.

(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 wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 4920 muizen en het daarbij verwachte maximaal ernstige 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.

Wel is er binnen de DEC lang gediscussieerd over het feit dat bij deze aanvraag een groot deel van de dieren mogelijk ernstig ongerief zal ondervinden en of dit niet voorkomen of verder verlaagd kan worden. De aard van dit onderzoek waarbij humane hersentumorcellen en de ontwikkeling daarvan bestudeerd worden in de hersenen van muizen zal leiden tot een grote kans op ernstig ongerief. Hersentumoren zullen van invloed zijn op het gedrag van de dieren en heeft neurologische symptomen tot gevolg bij de dieren. De dieren worden daarom intensief gemonitord en indien nodig uit de proef gehaald op basis van humane eindpunten.

De DEC realiseert zich de impact die dit model heeft voor de integriteit van de dieren en het resulteren daarvan in ernstig ongerief. De inschatting hiervan, door de wetenschappers, is realistisch. De DEC is van mening dat onderzoek naar de in dit project beschreven hersentumoren en de ontwikkeling van modellen van groot belang is voor het verkrijgen van meer kennis over hersentumoren en de mogelijkheid om aangrijpingspunten voor therapieën te ontdekken. Met als resultaat dat patiënten die hieraan leiden in de toekomst beter geholpen of behandeld kunnen worden.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

T.a.v. [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED] 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
AVD114002017841

Bijlagen

2

Datum 24 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 januari 2017. Het gaat om uw project "New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002017841. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

24 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD114002017841

Datum:
24 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD114002017841

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: 1081 HV AMSTERDAM

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
24 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD114002017841

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]
Adres: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juni 2017
Geplande einddatum: 31 mei 2022
Titel project: New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe therapieën voor de behandeling van hersentumoren
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC: [REDACTED] Amsterdam
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:

13 f functionaris (Proefdierdeskundige)

Plaats:

Amsterdam

Datum:

23 januari 2017

Datum:

24 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD114002017841



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Afdeling Crediteuren
VU Medische Centrum, [REDACTED]



**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
AVD114002017841
Bijlagen
2

Datum 24 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 januari 2017
Vervaldatum: 23 februari 2017
Factuurnummer: 170841
Ordernummer: Inkoopordernummer: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD114002017841	€ 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.

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 9 februari 2017 17:58
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD114002017841 (met het correcte aanvraagnummer)
Bijlagen: Melding bijlage.pdf

Geachte [REDACTED]

(Excuses voor het verkeerde aanvraagnummer in de eerste mail.)

Op 23 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer' met aanvraagnummer AVD114002017841. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

1) U schrijft in de bijlages dierproeven dat dieren van beide geslachten kunnen worden gebruikt, maar dat per experiment een geslacht wordt ingezet. Wat bedoelt u hiermee? Worden dieren van verschillende geslachten in parallel in experimenten gebruikt of kan het gebeuren dat bijvoorbeeld in de eerste 2-3 jaren dieren van een geslacht worden ingezet en daarna van het andere geslacht? Voor de volledigheid van uw aanvraag verzoeken we u dit punt te verhelderen en ook uit te leggen hoe er voor een of ander geslacht wordt gekozen.

2) U geeft aan dat dieren in groepen worden gehuisvest, maar als de dieren voor langer dan 2 dagen vechten worden deze apart gezet. Als kooigenoten worden geëuthanaseerd en het herplaatsen in een andere groep een effect zou hebben op het experiment worden de dieren ook individueel gehuisvest. Hoe vaak verwacht u dat individuele huisvesting nodig zal zijn en voor hoe lang verwacht u dat de dieren alleen in een kooi zitten? Verwacht u ook vrouwtjes individueel te huisvesten? Wat voor maatregelen worden genomen om de individuele huisvesting te voorkomen en het ongerief van langdurige individuele huisvesting te verlagen?

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken, verzoeken we u om uw antwoord uiterlijk **donderdag, 16 februari 2017**, naar ons toe te sturen.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Aanvullende informatie AVD114002017841

Op 23 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer' met aanvraagnummer AVD114002017841. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

1) U schrijft in de bijlages dierproeven dat dieren van beide geslachten kunnen worden gebruikt, maar dat per experiment een geslacht wordt ingezet. Wat bedoelt u hiermee? Worden dieren van verschillende geslachten in parallel in experimenten gebruikt of kan het gebeuren dat bijvoorbeeld in de eerste 2-3 jaren dieren van een geslacht worden ingezet en daarna van het andere geslacht? Voor de volledigheid van uw aanvraag verzoeken we u dit punt te verhelderen en ook uit te leggen hoe er voor een of ander geslacht wordt gekozen.

Wanneer we nieuwe cellijnen gaan gebruiken voor tumor-inductie, zullen we deze nieuwe cellijn in mannelijke en in vrouwelijke dieren injecteren. Het geslacht waarin de tumor-inductie het meest succesvol is wordt vervolgens geselecteerd voor alle toekomstige experimenten met deze cellijn. De tumor cellijnen die we nu gebruiken, zijn allen geoptimaliseerd in vrouwelijke dieren. Wanneer een nieuw experiment met deze cellijnen wordt gedaan dan wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke dieren, dit om te voorkomen dat er extra dieren nodig zijn voor het optimaliseren van het diermodel.

2) U geeft aan dat dieren in groepen worden gehuisvest, maar als de dieren voor langer dan 2 dagen vechten worden deze apart gezet. Als kooigenoten worden geëuthanaseerd en het herplaatsen in een andere groep een effect zou hebben op het experiment worden de dieren ook individueel gehuisvest. Hoe vaak verwacht u dat individuele huisvesting nodig zal zijn en voor hoe lang verwacht u dat de dieren alleen in een kooi zitten? Verwacht u ook vrouwtjes individueel te huisvesten? Wat voor maatregelen worden genomen om de individuele huisvesting te voorkomen en het ongerief van langdurige individuele huisvesting te verlagen?

Individuele huisvesting zal slechts sporadisch voorkomen, de verwachting is in minder dan 5% van de dieren. Het kan voorkomen dat vrouwtjes individueel gehuisvest moeten worden wanneer de kooigenoten zijn geëuthanaseerd, dit zal zelden het geval zijn, en als het voorkomt dan zal dit over het algemeen aan het eind van een experiment zijn. Dientengevolge zal de individuele huisvesting in dit geval voor een periode van maximaal 3 weken zijn. Individuele huisvesting wordt voorkomen door: Dieren zo jong mogelijk groepsgewijs te huisvesten (zodat ze minder gaan vechten), en dieren indien mogelijk over te plaatsen naar een andere kooi wanneer er individuele huisvesting dreigt.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken, verzoeken we u om uw antwoord uiterlijk **donderdag, 16 februari 2017**, naar ons toe te sturen.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] AMSTERDAM
[REDACTED]

**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
AVD114002017841
Bijlagen
1

Datum 20 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 23 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer" met aanvraagnummer AVD114002017841. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vragen van de CCD met betrekking tot het geslacht van de dieren en de huisvesting beantwoord.

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 "New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

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

In dit project is er sprake van ongeriefcategorie Ernstig.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 23 januari 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:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD114002017841

Bezwaar

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

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

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

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

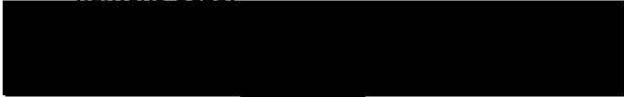
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peute
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD114002017841



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: 1081 HV AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2022, voor het project "New therapeutic strategies for the treatment of brain cancer" met aanvraagnummer AVD114002017841, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 23 januari 2017, ontvangen op 23 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Protocol for brain tumour transplantation				
	Muizen (Mus musculus) / immuunincompetent	600	66% Ernstig 34% Matig	
3.4.4.2 Protocol for treatment of brain tumours.				
	Muizen (Mus musculus) / immuunincompetent	4.320	68% Ernstig 32% Matig	

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2023

Aanvraagnummer:

AVD114002017841

plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

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



Aanvraagnummer:
AVD114002017841

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:

AVD114002017841

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

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