

	Inventaris Wob-verzoek W17-12								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS2017858	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x			x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x			x	
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5				x			x	
9	DEC-advies				x		x	x	
10	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
11	Aanvullende vragen en antwoorden				x		x	x	
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		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>	☐ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11600 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum
		KvK-nummer	27366422
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Albinusdreef 2
		Postbus	9600
		Postcode en plaats	2300 RC Leiden
		IBAN	NL11DEUT0451001400
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☒ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | ☐ Dhr. ☐ Mw. |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- ☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *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 | 1 - 8 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 8 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van elementen van de Transforming Growth Factor- β signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Identificeren van nieuwe therapeutische aangrijpingspunten om tumor groei en uitzaaiingen te verminderen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------|
| Naam DEC | DEC Leiden |
| Postadres | [Redacted] LUMC |
| | Postbus 9600 |
| | 2300 RC Leiden |
| E-mailadres | [Redacted] |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1827 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

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

Naam

Functie

Gemandateerd vergunninghouder

Plaats

Leiden

Datum

Handtekening



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- | | |
|--|---|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | <u>11600</u> |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | <u>Leids Universitair Medisch Centrum</u> |
| 1.3 Vul de titel van het project in. | <u>Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van de Transforming Growth Factor-β signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren</u> |

2 Categorie van het project

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

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- | | |
|----|--|
| 1. | Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn. |
| 2. | Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en). |
| 3. | Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het |

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Kanker is een van de belangrijkste doodsoorzaken in de westerse wereld en de incidentie neemt nog steeds toe. Het merendeel van de patiënten overlijdt ten gevolge van metastasering van de tumoren. Het proces van disseminatie en uitgroei van tumoren wordt sterk beïnvloedt door de interacties tussen verschillende celtypen in solide tumoren. Huidige therapieën berusten vaak op chirurgische verwijdering van de tumor, al dan niet aangevuld met chemotherapie of bestraling en in enkele gevallen targeted therapie, gericht op specifieke signaal transductie routes. De meeste therapieën richten zich op de epitheliale tumor cellen, maar onderzoek van onze groep en anderen heeft duidelijk laten zien dat er een cruciale rol is voor interacties tussen epitheliale tumoren cellen en het endotheel (in de vorm van angiogenese), de omringende fibroblasten (die een groot deel van het tumor stroma vormen) en de immuun cellen. Binnen deze interacties spelen verschillende signaal transductie routes een belangrijke rol. Het onderzoeken van deze routes en therapeutische interventies in deze routes vereist een volledig organisme om de bevindingen uit eerdere *in vitro* co-cultures celtypen te valideren en systemische effecten te bestuderen. Het proces van het uitzaaien van een tumor door interacties tussen verschillende celtypen naar een ander orgaan is *in vitro* helaas nog niet mogelijk. Dit wordt veroorzaakt door de verschillende fasen die een tumorcel doorloopt tijdens het uitzaaien, zoals ontsnappen aan de tumor, overleven in de bloedsomloop, engrafting en signalen van verschillende celtypen om uitgroei te initiëren. Ons onderzoek richt zich met name op receptoren en liganden van de Transforming Growth Factor- β familie. Deze familie bestaat uit ~33 liganden, waaronder de TGF- β s, bone morphogenetic proteins (BMPs) en activins. Een groot aantal receptoren reguleert de onderliggende signaaltransductie routes die een belangrijke rol spelen in fysiologische processen zoals proliferatie, differentiatie, apoptose, angiogenese en regulatie van het immuunsysteem. Cytokines uit de TGF- β familie zijn cruciaal voor embryonale ontwikkeling en spelen een belangrijke rol in tumor progressie en metastasering. Dit wordt verder onderstreept door het grote aantal klinische trials die lopen naar inhibitie van TGF- β in tumoren en fibrose (et al Growth Factors 2011).

Eerdere onderzoeken in onze onderzoeksgroep hebben laten zien dat liganden en receptoren uit de TGF- β familie van groot belang zijn in de interacties tussen verschillende celtypen in tumoren, en kunnen leiden tot verhoogde invasiviteit en tumor metastasering (et al Oncogene 2014, et al Oncogene 2016, et al Clin Ca Res 2016). Ons onderzoek heeft zich met name gericht op de We konden al een belangrijke rol laten zien voor deze receptoren in de progressie van tumoren, maar veel is nog onbekend over hoe deze interacties tot stand komen.

Ongepubliceerde data laten bijvoorbeeld een sterk effect zien van cel type specifieke deletie van TGF- β receptoren, in tumor initiatie, via paracrine interacties tussen epitheelcellen, fibroblasten en het immuunsysteem. Vanwege de interacties tussen fibroblasten, epitheel en het immuunsysteem zijn deze experimenten niet na te bootsen *in vitro* en is onderzoek in muismodellen noodzakelijk.

Voor het translationele therapeutische onderzoek richting wij ons op de vraag, hoe een maximaal therapeutisch effect bereikt kan worden door targeting van deze receptoren met neutraliserende antilichamen, zowel in monotherapy en door combinaties van therapieën met andere recent ontwikkelde targeted therapies of conventionele therapieën. Onze eerdere gepubliceerde (et al Oncogene 2014, et al Oncogene 2016, et al Clin Ca Res 2016) en ongepubliceerde experimenten hebben laten zien dat er mogelijk groot therapeutisch benefit is van het targetten van endoglin. In deze experimenten hebben we dit alleen laten zien in borsttumoren. Huidige experimenten richten zich op darmtumoren, maar in de toekomst willen we verschillende andere tumoren, zoals het hepatocellulair carcinoom (HCC), vulva tumoren en pancreas tumoren waarin endoglin een belangrijke rol speelt (hoge expressie, sterke correlatie met tumorgroei en metastasering) bekijken en ook de combinaties met andere therapieën. Vanwege de verschillende cellen die een rol spelen in de therapeutische effecten en in de toxiciteit van deze compounds is het uitvoeren van muizenexperimenten hiervoor noodzakelijk.

Binnen huidige en toekomstige projecten willen we ons richten op fundamenteel onderzoek hoe de TGF- β familie bijdraagt aan de interacties tussen epitheliale tumor cellen en het tumor stroma en hoe dit de progressie en metastasering van tumoren beïnvloedt. Dit willen we onderzoeken door gebruik te maken van celtype specifieke knockout muizen, die reeds aanwezig zijn. Dit zal fundamentele nieuwe inzichten geven in de rol van de TGF- β familie in tumor initiatie en progressie, wat toekomstig vertaald kan worden naar klinische toepassingen. Verder willen we in een translationele setting onderzoeken hoe we therapeutisch deze interacties en hopelijk daarmee de pro-metastaserende effecten kunnen inhiberen. Dit willen we zowel in monotherapie onderzoeken als in nieuwe combinaties met bestaande medicatie. Deze experimenten moeten aanleiding geven tot nieuwe klinische trials met betrekking tot targeting van de TGF- β familie als monotherapie of in combinatie met andere therapieën. Dit is realiseerbaar door nauwe samenwerking met bedrijven die deze neutraliserende antilichamen in klinische trials testen op mensen ontwikkelen op dit moment.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

In dit project willen we onderzoeken wat de rol is van de TGF- β signaaltransductieroute in initiatie, progressie en metastasering van solide tumoren en hoe we hier therapeutisch op in kunnen grijpen. Specifiek zijn de 2 vraagstellingen van dit project:

1. Wat is de invloed van manipulatie van TGF- β receptoren op epitheliale-stromale interacties in epitheliale homeostase en tumor initiatie, groei en metastasering?
2. Welke therapeutische interventies gericht op TGF- β in monotherapie of in combinatie zijn het meest effectief in monotherapie en in nieuwe combinaties met conventionele of targeted therapies

Onze aandachtsgebieden zullen zijn: colorectale carcinomen, het hepatocellulair carcinoom, pancreascarcinoom en vulva tumoren. De keuze voor deze tumoren berust op hoge expressie TGF β family members en correlatie met klinisch beloop in patiënten, gecombineerd met prevalentie (colorectale tumoren), of zeer beperkte huidige behandelingsmogelijkheden (hepatocellulair carcinoom (HCC), pancreas en vulvatumoren).

Haalbaarheid:

In het Leids Universitair Medisch Centrum wordt binnen het profileringsgebied Cancer Pathogenesis and Therapy veel onderzoek gedaan naar onderliggende mechanismen van tumor progressie en metastasering. Binnen dit samenwerkingsverband werkt onze onderzoeksgroep samen met verschillende andere groepen om de toepasbaarheid van targeting van de TGF- β familie. Door het combineren van expertise binnen andere afdelingen zoals Pathologie (vulva tumoren), heelkunde (pancreas tumoren), immunohepatologie en bloed transfusie (combinatie studies moleculaire celbiologie (combinatie studies werken wij aan nieuwe innovatieve kanker therapieën. We maken gebruik van de meest geavanceerde *in vitro* en *in vivo* modellen om op hoog internationaal niveau translationeel kankeronderzoek te doen.

De doelstelling om de TGF- β signaaltransductie route en mogelijk therapeutische interventies hierin opgehelderd te krijgen wordt door ons als haalbaar geacht. We hebben een sterk onderzoeksteam met veel expertise op het gebied van dierexperimenteel werk en werken tevens, voor de modellen waar wij de expertise nog niet hebben, samen met onderzoeksgroepen (immunohepatologie en bloedtransfusie, heelkunde) die deze modellen routinematig gebruiken. In de afgelopen jaren zijn de meeste diermodellen en technieken ontwikkeld en geoptimaliseerd voor onze toepassingen. De resultaten behaald met deze experimenten zijn gepubliceerd in toonaangevende tijdschriften zoals Gastroenterology, Cancer

Research, Oncogene, Clinical Cancer Research en anderen. We maken veel gebruik van geavanceerde orthotopische modellen met mogelijkheden voor bioluminescente imaging, waardoor het aantal dieren duidelijk beperkt wordt. Onze studies zijn via onze samenwerking met een aantal farmaceutische bedrijven ook van belang om afwegingen te maken voor de initiatie van klinische studies. Vanuit de aanvragende afdeling hebben de PIs veel vergelijkbare studies gepubliceerd in toonaangevende tijdschriften. Ten tweede is voldoende financiering gerealiseerd uit toegekende fondsen van het Alpe D'HuZes fonds, Stichting Fonds Oncologie Holland, Stichting Swarttouw-Hijmans en uit afdelingsbudget, wat de haalbaarheid van deze studies onderstreept. Verder worden de combinatiestudies mede gefinancierd door [REDACTED] die zowel kosten van de experimenten als personele lasten financieren voor voorgestelde combinatie studies. Andere subsidieaanvragen met betrekking tot voorgestelde projecten zijn nog onder review (NWO, Maag- Lever-Darm stichting en KWF kankerbestrijding).

3.3 Belang

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

Kanker is de belangrijkste doodsoorzaak in Nederland; 1 op de 3 mensen krijgt kanker, waarbij er jaarlijks ruim 43,000 mensen overlijden. Darmkanker behoort tot een van de meest voorkomende kanker soorten met 15,500 diagnoses en ruim 4900 sterfgevallen in 2014 (cijfersoverkanker.nl). Pancreas- en levertumoren komende minder vaak voor maar zijn gekenmerkt door een slechte prognose: 6% van alle kanker sterfte is afkomstig van pancreastumoren. Vulvatumoren behoren tot een zeldzamere vorm van tumoren, maar zijn wel gekenmerkt door een bijzonder slechte kwaliteit van leven voor patiënten die lijden aan deze ziekte. In eerdere studies hebben we laten zien dat [REDACTED]. Dit soort nieuwe therapeutische benaderingen kunnen van groot belang zijn voor patiënten met solide tumoren. Deze therapieën kennen ook duidelijk minder bijwerkingen, waardoor de kwaliteit van leven van deze patiënten gewaarborgd wordt. Om de aangrijpingspunten (liganden/receptoren) van deze therapieën en de mogelijk effecten op verschillende celtypen die deze liganden en receptoren tot expressie brengen in kaart te kunnen brengen, is fundamenteel onderzoek nodig. Door specifieke deletie van bijvoorbeeld een receptor op fibroblasten, epitheel cellen of immuun cellen kunnen we duidelijk de fysiologische rol onderzoeken en tevens voor medicatie onderzoeken waar de werkzaamheid op berust. Tezamen met de therapeutische (combinatie) studies geeft dit nieuwe behandelingsstrategieën voor mensen met CRC, HCC of vulvatumoren.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Binnen dit project komen de volgende 5 jaar de volgende vraagstellingen centraal te staan, die we volgens onderstaande strategie zullen benaderen:

1. Wat is de invloed van manipulatie van TGF- β receptoren op epitheliale-stromale interacties in epitheliale homeostase en tumor initiatie, groei en metastasering?

Om te onderzoeken hoe TGF- β en BMP signalering weefsel homeostase beïnvloeden en om de potentiële therapeutische effecten en risico's van deze therapie te kunnen inschatten zijn deze experimenten noodzakelijk. Bijvoorbeeld om te kunnen bepalen of de effecten worden veroorzaakt door targeting van de receptor op een epitheelcel of fibroblast (aangezien dat mogelijk tegengestelde effecten kan hebben), zijn celtype specifieke knockout dieren noodzakelijk. Hiervoor maken we gebruik van muizen met induceerbare, weefsel specifieke CRE-expressie, in combinatie met muizen waarin belangrijke genen voor ons onderzoek (bijvoorbeeld [REDACTED]) geflankeerd zijn door LoxP residuen. Door de cel- of weefsel specifieke CRE expressie vindt recombinatie alleen in deze cellen plaats, op het moment dat CRE-expressie geïnduceerd wordt, in de cellen met activiteit van de gekozen promotor. Spontane tumor vorming door genetische achtergrond of chemisch geïnduceerde carcinogenese kan worden onderzocht op deze manier. Ook transplantatiestudies met gemodificeerde cellen (tumorcellen

en/of fibroblasten, overexpressie of knockdown van receptoren of liganden uit TGF- β familie) in muizen behoren hiertoe. Ook willen we in deze experimenten bekijken hoe leverfibrose als voorstadium van HCC beïnvloed wordt door [REDACTED] TGF- β receptoren.

2. Welke therapeutische interventies gericht op TGF- β in monotherapie of in combinatie zijn het meest effectief?

Om deze onderzoeksvraag te beantwoorden willen we ons richten op neutraliserende antilichamen tegen liganden en receptoren van de TGF- β familie. Door samenwerkingen met farmaceutische bedrijven en onze jarenlange ervaring met het genereren van dit soort targeting molecules hebben we een aantal goede therapeutica die we willen testen in diermodellen die sterk de patiënten-situatie benaderen. Hiervoor willen we zowel modellen van primaire tumorgroei gebruiken, maar ook klinisch zeer relevante modellen waarbij we chirurgisch de tumor verwijderen om post-operatieve recidieven en metastasen te verminderen. Omdat wij verwachten dat, zeker klinisch gezien, een combinatie van behandelingen effectiever zal zijn dan een monotherapie en onze eerdere studies dit ook reeds hebben laten zien, willen we targeting van TGF- β liganden combineren met [REDACTED]. De tumormodellen waarin we dat willen testen zijn CRC, pancreas- en vulvatumoren en fibrose gerelateerde HCC, ook inclusief resectie van de primaire tumor. Om targeting van deze tumoren te bevestigen willen we ook met gelabelde antilichamen de tumoren visualiseren.

Er duidelijk verband tussen de 2 vraagstellingen; in vraagstelling 1 wordt kennis verkregen over de rol van deze receptoren waardoor zowel over potentie als mechanisme van therapeutische targeting veel informatie wordt verkregen. De experimenten onder vraagstelling 2 dragen bij aan het inschatten van therapeutisch potentieel van deze behandelingen. **De experimenten vinden parallel plaats. Op basis van eerder geïdentificeerde targets wordt gestart met therapeutische studies gedaan, terwijl nieuwe targets geïdentificeerd worden (vraagstelling-1) op basis van de mechanistische studies en door kunnen gaan naar therapeutische studies bij bewezen belang.**

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

Voor onderstaande onderzoeksvragen hebben we weergegeven welk type dierproef we daarvoor uit dienen te voeren om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. De experimenten staan ook schematisch weergegeven in **onderstaande flowcharts-1** (behorende bij doel-1) en flowchart-2 (behorend bij doel-2).

1. Wat is de invloed van manipulatie van TGF- β receptoren op epitheliale-stromale interacties in epitheliale homeostase en tumor initiatie, groei en metastasering?

Om deze vraag te kunnen beantwoorden moeten we gebruik maken van celtype specifieke knockout muizen. Daartoe hebben we reeds muizen gekruist met celtype specifieke CRE expressie (bijvoorbeeld [REDACTED] en gladde spiercellen), met muizen waarbij het gen van interesse (bijvoorbeeld [REDACTED]) geflankeerd wordt door loxP residuen. Na inductie van CRE expressie vindt recombinatie plaats en deletie van het gen. Deze modellen willen we gebruiken om:

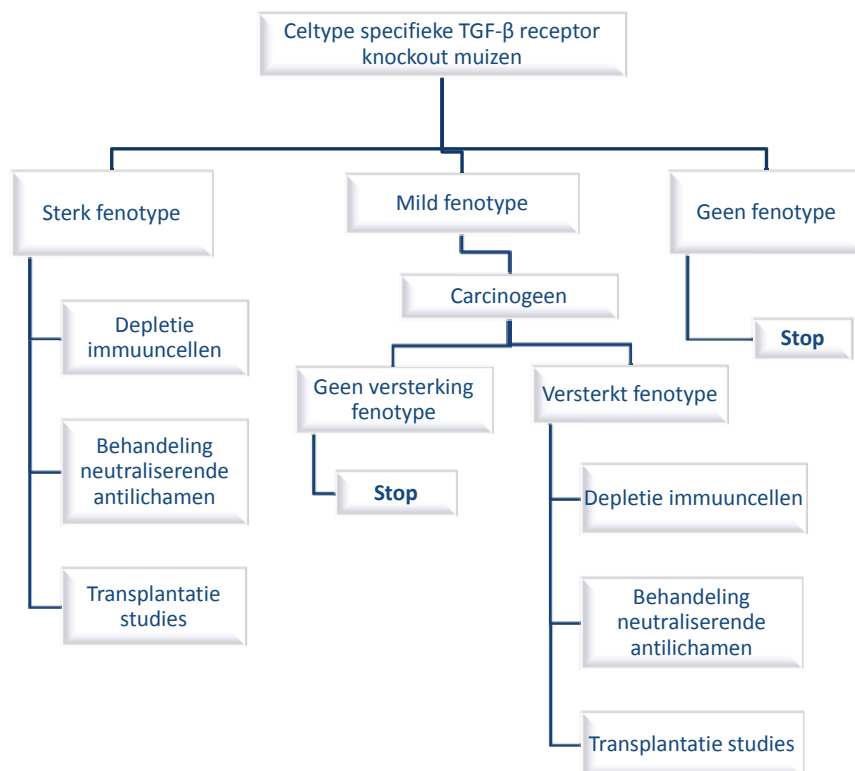
- **Spontane veranderingen in weefsel homeostase/poliep en tumor groei tgv verlies van deze receptoren te bekijken.** Hierbij wordt de deletie van receptoren of liganden van de TGF- β familie celtype specifiek geïnduceerd en worden de dieren opgeofferd na een vooraf gestelde periode (bijvoorbeeld 6 maanden in geval van [REDACTED] of bij tekenen van tumorgroei of andere aan de knockout gerelateerd ongerief. Dit model is representatief voor vroege fasen van carcinogenese, en geeft informatie hoe mutaties kunnen leiden tot benigne of maligne groei. Voor de timing en volgorde van experimenten wordt verwezen naar flowcharts 1 en 2. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-1.

- **Te onderzoeken of chemisch geïnduceerde carcinogenese verandert.** Hiertoe wordt de celttype specifieke knockout geïnduceerd en wordt er een "second hit" gegeven door toediening van een carcinogeen (e.g. azoxymethaan) en/of een combinatie van een carcinogeen met ontsteking (bijvoorbeeld Dextran Sodium Sulphate-geïnduceerde colitis). Dit model kan inzichten geven in spontane tumorvorming en de gevolgen van een second hit of ontsteking in dit proces. Het is mogelijk dat deletie van een receptor een mild fenotype (bijv uitsluitend poliep vorming en geen invasieve tumoren) geeft, maar dat maligne ontaarding na een second hit (bijvoorbeeld geïnduceerd door azoxymethaan-DSS) plaatsvindt. Voor de timing en volgorde van experimenten wordt verwezen naar flowcharts 1 en 2. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-1.

- **Orthotope transplantatie van cellen of tumor stukjes.** Hiertoe worden tumorcellen met knockdown van bepaalde receptoren of stukje tumoren bestaande uit die cellen orthotoop geplaatst (dwz in de pancreas, darm of vulva van de muis). Dit model is representatief voor invasieve tumor groei en de effecten op metastasering van tumoren in tegenstelling tot de benigne en vroeg maligne lesies in chemisch geïnduceerde tumor modellen in de darm. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-2.

- **Combinatie van celttype specifieke deletie van TGF- β receptoren en neutraliserend antilichamen tegen TGF- β family members** of

Flowchart doel-1: Wat is de invloed van manipulatie van TGF- β receptoren op epitheliale-stromale interacties in epitheliale homeostase en tumor initiatie, groei en metastasering?



Flowchart-1. Overzicht experimenten met betrekking tot doel-1. * als op basis van histologische analyses afwijkingen gevonden worden in weefsels, kan het toevoegen van een carcinogeen overwogen worden

immuuncel populaties.

Door uitschakelen van bijvoorbeeld op fibroblasten te vergelijken met muizen die met anti- behandeld worden kunnen de effecten op verschillende celttypen beoordeeld worden. Volledige knockout muizen voor nagenoeg alle TGF β receptoren zijn niet levensvatbaar.

Om te onderzoeken of het fenotype een gevolg is van een andere compositie van immuun infiltraat, willen we verschillende populaties zoals kunnen

neutraliseren. Voor de timing en volgorde van experimenten wordt verwezen naar flowcharts 1 en 2. Deze experimenten staan beschreven in

Flowchart doel-2: Welke therapeutische interventies gericht op TGF- β in monotherapie of in combinatie zijn het meest effectief?

bijlage-1.

2. Welke therapeutische interventies gericht op TGF- β in monotherapie of in combinatie zijn het meest hoopgevend om in klinische trials op patiënten met solide tumoren te gaan testen (flowchart 2)?

Therapeutische [redacted] met neutraliserende antilichamen hebben we reeds eerder gebruikt in diermodellen voor borst- en colorectale tumoren. In deze studie willen we dat uitbreiden naar modellen voor CRC, HCC, pancreastumoren en in combinatie met andere nieuwe therapieën. Na inductie van de tumoren worden de muizen behandeld met neutraliserende antilichamen tegen [redacted] liganden uit de TGF- β familie, gebaseerd op *in vitro* bevindingen. Dit wordt gecombineerd met andere nieuwe therapieën die potentieel versterkend kunnen werken,

Flowchart-2. Overzicht experimenten met betrekking tot doel-2. Behandelingen zullen worden getest op primaire tumorgroei en/of als adjuvante behandeling na resectie van de primaire tumor afhankelijk van de specifieke vraagstelling. Keuze momenten zijn gelijk voor beide set-ups.

Dit zal zowel getest worden op muizen met een primaire tumor, maar ook in muizen waarbij de tumor operatief verwijderd is, om zo nauwkeurig mogelijk de situatie van patiënten na te kunnen bootsen. Het type dierproef dat we hiervoor uit willen voeren zijn:

- **Chemisch geïnduceerde darm tumoren**, die we behandelen met anti-TGF- β therapie (gericht tegen liganden of receptoren), al dan niet in combinatie met [redacted]. Om het mechanisme te ontrafelen willen we deze experimenten ook combineren met depletie van effector cellen, [redacted]. Voor de timing en volgorde van experimenten wordt verwezen naar flowchart 2. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-1.
- **Orthotope en subcutane modellen voor darm-, lever-, vulva-, en pancreastumoren**, die we behandelen zoals hierboven beschreven. Om het mechanisme te ontrafelen willen we deze experimenten ook combineren met depletie van effector cellen [redacted]. Dit model geeft een beeld hoe efficiënt therapie kan zijn als behandeling van een primaire tumor. De keuze voor orthotope of subcutane modellen zal gemaakt worden op basis van de exacte vraagstelling van het experiment. Als we de invloed van stroma willen bekijken zullen we meestal gebruik maken van orthotope modellen en als het gaat om primaire epitheliale tumorcel groei of PDX, subcutane modellen. Uit lopend onderzoek weten we dat het gedrag en immuunpopulatie van subcutane en orthotope tumoren nogal verschilt. Voor de timing en volgorde van experimenten wordt verwezen naar flowchart 2. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-2 en -3.
- **Orthotope resectie modellen**, waarbij we na orthotope transplantatie van de primaire tumor deze chirurgische verwijderen en de muizen (neo-)adjuvant behandelen, sterk gelijkend op de

patiënten situatie. In deze experimenten zal bekeken worden of er therapeutische potentieel is om dit soort therapieën in een adjuvante setting bij patiënten toe te passen. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-2.

- **Fibrose- afhankelijk hepatocellulair carcinoom groei.** In een muismodel waarbij fibrose wordt geïnduceerd willen kijken of therapeutische remming van TGF- β liganden of receptoren fibrose kan verminderen. Tevens willen we dit fibrose model combineren met een orthotoop HCC model en onderzoeken wat de therapeutische relevantie is van TGF- β targeting in HCC, in monotherapie en in combinatie met [REDACTED]. Voor dit model willen we leverfibrose induceren door middel van CCL4, gevolgd door orthotope injectie van muis HCC cellen. Dit model is recent in de literatuur beschreven (Reiberger et al Nat Prot 2015) en geeft een goede representatie van het humaan HCC. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-4.
- **Modellen voor experimentele levermetastasen.** Om het directe effect van TGF- β members op engraftment en uitgroei van (colon)-tumor cellen en/of fibroblasten te onderzoeken (co-) injecteren we de cellen in de milt en bestuderen uitgroei van de cellen in de lever. Deze experimenten staan beschreven in bijlage-5.

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

De experimenten behorende bij doel-1 zullen zorgen voor fundamentele kennis over hoe TGF- β receptoren de initiatie en progressie van tumoren beïnvloeden. Huidige experimenten richten zich op [REDACTED]

[REDACTED] De opbouw in deze experimenten is dat de TGF- β member wordt uitgeschakeld in specifieke celtypen en gekeken of er een fenotype (poliep of tumorontwikkeling in de darm) optreedt. Als dat het geval is volgen studies naar het mechanisme hoe dit veroorzaakt wordt (interactie met immuuncellen, paracrine interactions met epitheel) *in vitro* en vervolg bewijs van de *in vitro* data *in vivo*. Hierbij worden dan ook de orthotope modellen gebruikt.

Met betrekking tot het tweede doel is er een duidelijke opbouw; het effect van anti-TGF- β therapie wordt bekeken op primaire tumor groei en metastasering, zowel in monotherapie als in combinatie met [REDACTED]. Door deze twee afzonderlijke doelen te combineren, kunnen we controle groepen (zowel placebo groepen als monotherapie groepen) combineren binnen hetzelfde experiment, wat het aantal benodigde dieren vermindert. Afhankelijk van effectiviteit wordt besloten of verdere experimenten [REDACTED] zinvol zijn.

De effectiviteit van TGF- β targeting als adjuvante therapie wordt eerst onderzocht in het darmkanker model als monotherapie. Op basis van eerdere experimenten in vergelijkbare modellen voor borstkanker verwachten wij hier sterke effecten. Afhankelijk van de resterende hoeveelheid tumor wordt besloten of een nieuw experiment met gecombineerde behandelingen zinvol wordt geacht. Met betrekking tot de [REDACTED] combinatie wordt eerst een pilot experiment uitgevoerd om het ongerief en effectiviteit van [REDACTED] vast te stellen. Pilot experimenten laten zien dat het ongerief ten gevolge van het [REDACTED] zeer beperkt is. Op basis van deze experimenten wordt besloten of de combinatie met bijvoorbeeld endoglin targeting getest gaat worden.

Met betrekking tot de fibrose-HCC gerelateerde experimenten wordt zowel het effect op fibrose alleen als op fibrose-geassocieerde HCC ~~wordt~~ onderzocht om een klinisch duidelijk beeld te krijgen waar de meeste winst te behalen valt. Aangezien wij op basis van ongepubliceerde *in vitro* bevindingen verwachten dat [REDACTED]

[REDACTED] eerste experiment dat gepland staat. Mocht dit geen effect blijken te hebben op de fibrose of fibrose-geassocieerde HCC worden de patient derived xenograft (PDX) experimenten en combinatiebehandelingen niet uitgevoerd.

Samenvattend gaat deze set van experimenten een duidelijk beeld geven over de in de kliniek te verwachten therapeutische effecten van anti-TGF- β therapie en de meest kansrijke combinaties van

medicatie om in klinische trials te onderzoeken.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Spontane en chemisch geïnduceerde tumor modellen
2	Orthotope tumormodellen
3	Subcutane tumor modellen
4	Orthotoop, fibrose gerelateerd hepatocellulair kanker model
5	Modellen voor experimentele metastasen
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	AVD116002015271	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Leids Universitair Medisch Centrum	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Spontane en chemisch geïnduceerde tumor modellen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Om een beter begrip te krijgen van de rol van verschillende celtypen in de darm bij het ontstaan van darmpoliepen, de progressie naar geavanceerde tumoren en uiteindelijk maligne ontaarding (met invasie en metastasering als gevolg) in de context van veranderde Transforming Growth Factor- β gemedieerde signalering willen wij gebruik maken van cel-specifieke (conditionele) knockout/knockin muismodellen. Door het cel-specifiek uitschakelen/overactief maken van TGF- β signalering in transgene muislijnen, bijvoorbeeld alleen in de epitheliale cellen van de darmmucosa en/of mesenchymale/stromale cellen in de submucosa, zal de kennis over het ontstaansmechanisme en daaropvolgende progressie van darmpoliepen/-tumoren door veranderingen in TGF- β signalering toenemen. Dit is mogelijk door aan het eind van het experiment weefsels te isoleren voor nadere analyses in het laboratorium. Ook het meten van biomarkers in het bloed en het monitoren van het gewicht van de muizen gedurende de experimenten zijn belangrijke uitleesparameters. Therapeutisch (doel-2) willen we zien hoe het ingrijpen in vroege fases van tumor ontwikkeling de tumorgroei kan inhiberen.

De resultaten van deze dierproeven kunnen uiteindelijk worden gebruikt om vroegtijdig (hoog-risico) precursoren van darmkanker te identificeren en classificeren. Verder kunnen we medicatie testen die specifiek ingrijpt op componenten van de TGF- β in vroege fases van tumorigenese.

Primaire uitkomstmaten:

- Intestinale poliep- en tumorvorming (hoeveelheid poliepen in zowel dunne als dikke darm)
- Verstoring van de normale darmarchitectuur (zowel dunne als dikke darm op microscopisch niveau)
- Circulerende cytokines en immuunprofiel in perifere bloed

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

Initiëren conditionele knockout:

- intraperitoneale (IP) of intraveneuze (IV) injectie (maximaal 5 keer, maximaal 0,1 ml/10 g lichaamsgewicht per injectie voor IP of 0.05 ml/10 g lichaamsgewicht voor IV) of orale sondevoeding (maximaal 5 keer, maximaal 100 microliter per keer)

Afnemen monsters voor analyse:

- Afnahme van veneus bloed via staartvene (maximaal 5 keer, minstens 2 dagen interval en maximaal 25 microliter per bloedafname)
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂), met zo min mogelijk ongerief, waarna uitsnemen van weefsels en serum voor verdere analyse in het laboratorium

Optioneel chemisch geïnduceerde tumoren (zie flowchart):

- Eenmalige IP toediening van het carcinogeen azoxymethaan (maximaal 0.1 ml/10 g lichaamsgewicht) om het proces van poliep initiatie, progressie naar invasief carcinoom en metastasering te versnellen met als doel het geobserveerde fenotype beter te kunnen beschrijven. Azoxymethaan is een gen muterend agens welke frequent wordt gebruikt in proefdieren om de mechanismen van darmkanker initiatie, progressie en chemopreventie te onderzoeken.
- 3 cycli van maximaal 7 dagen waarbij Dextran Sulfate Sodium (DSS) via het drinkwater wordt toegediend om darmontsteking te induceren en daarmee tumorigenese te versnellen. Indien de ontsteking te heftig is (beoordeeld op basis van **aanhoudend rectaal bloedverlies en gewichtsverlies (>10% in 1 dag)**) kan aantal cycli of duur cycli beperkt worden.

Optioneel monitoring poliepvorming:

- Volgen van poliepgroei door middel van endoscopie onder isofluraan anesthesie, maximaal 10 minuten, maximaal 1x per 2 weken.

Optioneel (na respons en indicaties voor betrokkenheid immuuncellen) behandelingen en/of depletieren immuunpopulaties:

- Depletieren van verschillende immuuncelpopulaties dmv antilichamen, die maximaal 1x per week, IP worden toegediend, maximaal 8 weken. Wordt uitgevoerd als er respons op therapie of invloed op immuuncellen zichtbaar is.
- Maximaal 4x per week in het geval van combinatietherapie, of 2 keer in geval van monotherapie, afhankelijk van de medicatie subcutane, IP (0.1 ml/10gr), of IV (maximaal 100 µl) toediening van medicatie of [REDACTED] (IP, IV of intratumoraal, maximaal 50 µl). Combinatie toegepast op basis van criteria uit flowchart.

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

Bij vergelijkbare dierproeven in het verleden bij onze afdeling werd een variërend aantal poliepen/tumoren gezien na (conditionele) knockout/-in van componenten van de TGF- β signalering. Uit de literatuur blijkt ook dat het te verwachten aantal gevormde poliepen/tumoren sterk kan variëren waardoor het op voorhand vaststellen van het aantal benodigde dieren om statistische betrouwbare resultaten te verkrijgen lastig is. Wij hebben een berekening gemaakt van het benodigde aantal muizen op basis van het gemiddelde effect van de laatste paar experimenten en hieruit blijkt bij een spreiding van 25%, een verwacht effect van 35%, een power van 90% bij een alpha van 0.05 dat de groepsgroottes 11 muizen zijn. Voorafgaand aan het daadwerkelijke experiment zullen protocollen worden geschreven ter beoordeling van de IVD waarin de groepsgroottes op basis van het pilot experiment, ervaring en statistische berekeningen zullen worden vermeld.

Een experiment bestaat doorgaans uit drie groepen: één knockout/-in groep, één controlegroep waarbij wel het inductiemiddel wordt geïnjecteerd maar waarbij knockout/-in niet mogelijk is doordat de transgen(en) afwezig zijn, één controlegroep met (alle) transgen(en) zoals de eerste groep maar niet geïnjecteerd met het inductiemiddel en er dus geen knockout/-in plaats zou mogen vinden. Het geschatte aantal te onderzoeken celtypen is ongeveer 5, het aantal genconstructen 5, met of zonder toediening van azoxymethaan en DSS. Het maximaal aantal experimenten dat zal worden uitgevoerd is 30 met ieder minstens 2 en maximaal 5 experimentele condities. Dit geeft maximaal 1650 dieren.

B. De dieren

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

Muizen, vanuit eigen fok. Cel type specifieke (bijv. fibroblast-, darmepitheel-, endotheel-, etc specifieke), induceerbare CRE muizen zullen worden gekruist met muizen waarin het gen van interesse gefloxed is. Indien een transgene muislijn van interesse niet beschikbaar is binnen ons instituut zal deze van een geregistreerde fokker worden gekocht.
(Jong)volwassen dieren vanaf 4-20 weken oud: maximaal 1650, zowel mannetjes als vrouwtjes muizen zullen worden gebruikt.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Voordat een experiment met transgene muizen van start gaat zullen eerst onze hypothesen *in vitro* worden getest door middel van 2D (monolayer van darm(kanker)cellen) en 3D (intestinale organoïden) celkweek experimenten. In beide typen celkweek experimenten is het mogelijk om tot een redelijk niveau de *in vivo* situatie na te bootsen om zo een idee te krijgen of het te verwachten effect inderdaad plaats zal vinden. Echter zijn dergelijke kweeksystemen niet voldoende, omdat er veel meer celtypen, signaalstoffen en andere processen plaatsvinden in de darm waardoor in het verleden al veelvuldig is gebleken dat de *in vitro* resultaten niet te reproduceren zijn *in vivo*.

Vermindering: Ieder experiment zal degelijk worden opgezet en geëvalueerd worden of er verder wordt gegaan of dat verdere experimenten worden gestaakt. Hierna zal ieder experiment zorgvuldig worden uitgewerkt (inclusief degelijke power berekeningen) en besproken worden door leden van de onderzoeksgroep ervaren met dergelijke dierproeven vooraleer van start wordt gegaan met een vervolg experiment. Verder worden alleen muizen gebruikt met cel specifieke deleties waar we op basis van literatuur en eerdere experimenten voldoende aanleiding voor hebben. Tot slot hoeven we door het monitoren van poliepvorming dmv endoscopie geen muizen eerder op te offeren.

Verfijning: Het ongerief voor de proefdieren zal zo minimaal mogelijk worden gehouden door technisch ervaren en getraind personeel de dierproeven te laten uitvoeren. Tijdens de DSS cycli worden de muizen dagelijks gewogen om nauwkeurig het verwachte gewichtsverlies te kunnen monitoren en evt vroegtijdig de DSS toediening te kunnen beëindigen, wanneer het gewichtsverlies hiertoe aanleiding geeft. Met betrekking tot de andere modellen wordt tumorgroei nauwkeurig gemonitord door endoscopie onder kortdurende anesthesie, waardoor betere inschatting gemaakt kan worden van mogelijk ongerief. Deze muizen worden wekelijks gewogen.

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

Bij ieder experiment zullen alle individuele muizen wekelijks nauwkeurig worden geobserveerd en gemonitord door de onderzoeker. Daarnaast zullen de proefdiervverzorgers standaard dagelijks de dieren bekijken en zo nodig contact opnemen met de onderzoeker. Zodoende wordt onverwacht ongerief spoedig vastgesteld en waar nodig onmiddellijk gestopt. Nadelige milieueffecten zijn alleen te verwachten wanneer gebruik wordt gemaakt van azoxymethaan omdat dit een schadelijk middel is voor mens en dier (genmuterend agens). Dit middel zal daarom alleen door ervaren personeel worden toegediend in een

hiervoor geschikte zuurkast. De proefdiervverzorgers zullen tijdig op de hoogte worden gesteld en na toediening van het middel zullen de muizen voor minstens drie dagen in onderdruk worden gehuisvest in hun afzonderlijke IVC's. Al het materiaal (voer, bedding etc.) afkomstig van deze dieren zal de eerste drie dagen op een gecontroleerde wijze afzonderlijk worden afgevoerd. Hierna is er geen risico meer voor schade aan mens of dier.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Omdat bij deze langdurige experimenten niet ingeschat kan worden bij welke knockout en wanneer het ongerief kan optreden is pijnbestrijding niet mogelijk. Verder kunnen morfinomimetica de darm peristaltiek beïnvloeden en zijn NSAIDs vanwege hun bloedverdunnende en onstekingsremmende werking niet te combineren met het DSS geïnduceerde ontstekingsmodel en kunnen dus niet gebruikt worden. Bij het optreden van rectale prolapsen of grote poliepen op basis van de endoscopie, leidend tot pijn zullen de dieren uit experiment worden genomen.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De muizen zullen ongerief (stress, irritatie) kunnen ondervinden door de injecties of orale toediening van de middelen en door de bloedafnames. DSS geeft ontsteking van de dikke darm, waardoor bloederige ontlasting kan optreden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De handelingen horende bij het experiment. DSS beschadigd specifiek het darmepitheel van de dikke darm.

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

De uit te voeren experimentele handelingen die ongerief kunnen veroorzaken zullen alleen uitgevoerd worden door getraind en ervaren personeel en tot een minimum beperkt worden. Muizen worden tijdens de DSS cycli dagelijks gemonitord en de humane eindpunten worden zorgvuldig in acht genomen.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De Code of Practice kankeronderzoek in proefdieren zal in acht worden genomen. Het is onwaarschijnlijk dat de humane eindpunten die hierin beschreven staan worden bereikt. De dieren zullen worden geëuthanaseerd op het moment dat ze tekenen vertonen die aangeven dat ze pijn of ander ongerief ervaren zoals beschreven in de Code of Practice kankeronderzoek in proefdieren.

De muizen zullen worden opgeofferd bij sterk gewichtsverlies in korte tijd (>10% in 2-3 dagen, of >20% tov start experiment), aanhoudend rectaal bloedverlies **na de DSS cycli**, rectale obstructie (**ook beoordeeld dmv scapie beelden**). Ook als de muizen duidelijke tekenen van ongerief vertonen (zoals moeizame ademhaling, lethargisch gedrag of slechte vachtconditie of ander sterk afwijkend gedrag) worden de dieren uit experiment genomen. **De DSS cycli kunnen worden verkort of bij een te heftige ontsteking (>10% gewichtsverlies in een dag, hoge mate van rectaal bloedverlies beoordeeld door dierversorgers en onderzoeker).**

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

Alleen de proefdieren waar knockout/-in heeft plaatsgevonden lopen het risico om darmtumoren te ontwikkelen en kunnen daarom mogelijk deze eindpunten bereiken. Op basis van de eerdere dierproeven uitgevoerd door onze afdeling verwachten wij dat maximaal 10% van de proefdieren vroegtijdig geëuthanaseerd dient te worden omdat deze een humaan eindpunt heeft bereikt.

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief wordt ingeschat op gering zonder toediening azoxymethaan (**maximaal 825 dieren**) en DSS en matig bij het wel toedienen van azoxymethaan en DSS (**maximaal 825 dieren**).

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

De proefdieren worden gedood als onderdeel van het experiment om weefsels te isoleren en hierop onder andere immunologische analyses te kunnen doen in het laboratorium, of om verder ongerief te voorkomen doordat de darmtumoren verder groeien en invaderen/metastaseren.

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

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

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	AVD116002015271	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Leids Universitair Medisch Centrum	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Orthotope tumormodellen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Orthotope darm tumoren

Eerdere en lopende experimenten laten zien dat de er substantiële verschillen zijn tussen orthotope en subcutane tumoren. Vandaar dat het belangrijk is om verschillende therapieën en combinaties van therapieën te testen zowel in een orthotoop als subcutaan model (zie bijlage 3). In ons lab hebben we een orthotoop model voor CRC lopend, waarbij stukjes tumor gehecht worden op de caecale wand. Afhankelijk van de vraagstellingen gebruiken we hiervoor muis MC38 CRC cellen in C57/bl6 muizen of muis CT26 CRC cellen in Balb/c muizen. In dit model behoort resectie van de tumor tot de mogelijkheden. Een aanvullend nieuw model wat we willen opzetten is endoscopische injectie van deze cellen in de dikke darm van de muizen, de plaats waarbij bij mensen de meeste tumoren voorkomen. Het orthotope model geeft in tegenstelling tot het endoscopische model momenteel, meer mogelijkheden met betrekking tot resectie van de primaire tumor en transplantatie van tumor stukjes. In beide modellen wordt tumorgroei en metastasering gevolgd door middel van bioluminescentie. In deze modellen willen we progressie en metastasering van tumoren volgen en therapeutische interventies testen. Hierbij wordt zowel gekeken naar monotherapie als combinaties van bestaande en nieuwe therapieën en het mechanisme hoe deze therapieën werken. Zowel behandeling van primaire tumoren als na resectie van de primaire tumor wordt gekeken (adjuvante behandeling, klinisch zeer relevant).

Primaire uitkomstparameters;

- Tumorgroei op basis van bioluminescentie en na opofferen tumor gewicht en volume
- Metastasering op basis van bioluminescentie
- Immunrespons en activatie in bloed, organen en tumoren (in geval van immunotherapie)

Orthotope pancreas tumoren

Vanwege de hoge activiteit van de TGF- β pathway in pancreastumoren en hoge expressie van componenten uit de TGF- β pathway *in vitro* ligt hier veel therapeutische ruimte. Voor deze experimenten worden de muizen orthotoop ingespoten met humane BXP3 cellen al dan niet in combinatie met tumor geassocieerde fibroblasten (in immunodeficiënte Balb/c nude muizen) of KPC3 muizen pancreas tumorcellen (Kras G12D, P53 -/- cellen in C57/bl6 muizen voor studies in immuuncompetente muizen. Alle tumorcellen brengen luciferase tot expressie waardoor *in vivo* imaging van tumorgroei mogelijk is.

Primaire uitkomstparameters:

- Tumorgroei op basis van bioluminescentie en na opofferen tumor gewicht en volume
- Metastasering op basis van bioluminescentie
- [REDACTED] en activatie in bloed, organen en tumoren (in geval van [REDACTED])

Orthotoop vulva model:

Onze *in vitro* experimenten en analyse van patiëntmateriaal hebben laten zien dat er mogelijk groot therapeutisch potentieel is van targeting van de TGF- β signaaltransductieroute. Om zo nauwkeurig mogelijk de klinische situatie na te bootsen hebben wij een orthotoop model voor vulvatumoren opgezet. Dit muismodel willen we gebruiken om therapeutische interventies te testen. Tevens willen we dit model verder ontwikkelen om te bekijken of we ook een resectie van de tumoren kunnen doen, om zo de klinische situatie van post-operatieve recidieven en metastasering te benaderen. Primaire uitkomst parameters van deze experimenten zijn:

Primaire uitkomstparameters:

- Tumorgroei op basis van bioluminescentie en na opofferen tumor gewicht en volume
- Metastasering op basis van bioluminescentie
- [REDACTED] in bloed, organen en tumoren (in geval van [REDACTED])

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

Orthotope darm tumoren

Donormuizen:

- Subcutane injectie van tumorcellen in beide flanken van de muis, maximaal 200 μ l per injectie in zoutoplossing
- Regelmatig (maximaal drie maal per week) hanteren voor tumor meting via caliper. Muizen worden geëuthanaseerd als de tumor 500 mm³ is, **aangezien dit de grootte is nodig om te kunnen transplanteren zonder necrose in de tumor.**

Operatie orthotoop model:

- 30 minuten voor de operatie krijgen de dieren pijnbestrijding in de vorm van buprenorfine injectie subcutaan, maximaal 0.1 ml/10gr.
- Operatie vindt plaats onder geschikte anesthesie (isofluraan).
- Buikholte van de muis wordt geopend vervolgens wordt het caecum blootgelegd en een stukje van 2-3 mm³ tumor uit een subcutane donor getransplanteerd mbv resorbeerbaar hechtdraad
- Buikwand en de huid worden afzonderlijk gehecht met resorbeerbaar hechtdraad
- Tumor groei wordt gevolgd via bioluminescente imaging (totale duur maximaal 10 minuten, maximaal 2 keer per week, maximaal 10 weken)
- IP injectie (0.1 ml/10gr) luciferin, isofluraan anesthesie en imaging gedurende 1 min

Optioneel: Tumor resectie model (beschreven door Metildi et al 2014):

- Tumoren worden verwijderd uit het orthotoop model tussen de 7 en 20 dagen afhankelijk van de groei van de tumor (op basis van BLI signaal) na tumor initiatie.
- 30 minuten voor de operatie krijgen de dieren pijnbestrijding in de vorm van buprenorfine injectie subcutaan, maximaal 0.1 ml/10gr.
- Operatie vindt plaats onder anesthesie middels isofluraan.
- Buikholte van de muis wordt geopend vervolgens wordt het caecum blootgelegd het onderste gedeelte van het caecum met de primaire tumor wordt afgebonden met een stuk resorbeerbaar hechtdraad.
- Tumor wordt verwijderd door het stuk van het caecum met de tumor af te knippen.
- Caecum wordt schoon gemaakt met PBS en gesteriliseerd met jodium en terug geplaatst in de

buikholte.

- Buikwand en de huid worden afzonderlijk gehecht met resorbeerbaar hechtdraad
- Tumor groei (recurrence primaire tumor en groei metastasen) wordt gevolgd via bioluminescente imaging, maximaal 2x per week, maximaal 6 weken na resectie
- IP injectie met 0.1 ml/10gr luciferin, isofluraan anesthesie en imaging gedurende 1 min

Toediening van therapeutische neutraliserende of depleterende antilichamen via een van de volgende routes:

- Subcutane, IP of IV (maximaal 4 keer per week (combinatie therapie, anders maximaal 2 keer per week), maximaal 0.1ml/10g lichaamsgewicht, afhankelijk van toedieningsroute)
- Behandeling met [REDACTED] (IP, IV (max 100 µl) of intratumoraal (max 50 µl),

Endoscopisch orthotoop model (beschreven door: Zigmond et al 2011):

- Endoscopie maximaal 1x per week onder isofluraan anesthesie, 1 sessie duurt maximaal 10 minuten
- Injecties van tumor cellen tijdens de scopie via de endoscoop in de dikke darm van de muis, maximaal 2x in een zoutoplossing 50ul
- Nemen van een biopsie tijdens reguliere endoscopie maximaal 4x met een interval van minimaal 1 week
- Tumor groei wordt gevolgd via bioluminescente imaging
- IP injectie met 0.1 ml/10gr luciferin, isofluraan anesthesie en imaging gedurende 1 min

Monsterafname in orthotoop caecum en endoscopisch model

- Bloedafname via staartvene (maximaal 6 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uittreken van weefsels en serum *in vitro* analyse in het laboratorium

Optioneel: 24h voorafgaand aan opofferen, ten behoeve van imaging

- IV injectie van fluorescent gelabelde antilichamen, die geschikt zijn voor intra vitale beeldvormende technologie
- Imaging onder de IVIS onder isofluraan anesthesie

Optioneel: Toediening van inductiemiddel om conditionele knockout te initialiseren via een van de volgende routes:

- IP of IV injectie (maximaal 5 keer, maximaal 0,1 ml/10 g lichaamsgewicht per injectie)
- Orale sondevoeding (maximaal 5 keer, maximaal 100 microliter per toediening)

Orthotoop pancreas model:

Plaatsen van orthotope tumoren

- 30 minuten voor de operatie krijgen de dieren geschikte pijnbestrijding
- Operatie vindt plaats onder geschikte anesthesie.
- Huid en buikwand worden geopend zodat pancreas zichtbaar is, waarna eenmalig maximaal 50 µl in de pancreas wordt geïnjecteerd.
- Buikwand en de huid worden afzonderlijk gehecht met resorbeerbaar hechtdraad

Monitoren van tumorgroei:

- Muizen worden ingespoten met maximaal 0.1 ml/10g luciferine en onder isofluraan anesthesie gebracht waarna ze gedurende 1 minuut worden geimaged. Uiterlijk 6 weken na start van het experiment worden de muizen opgeofferd.
- Bloedafname via staartvene (maximaal 4 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)

Behandeling:

- Maximaal 4x per week in geval van combinatietherapie, of 2 keer in geval van monotherapie, afhankelijk van de medicatie subcutane, IP (0.1 ml/10gr) of IV (maximaal 100 µl) toediening van medicatie of [REDACTED] (IP, IV (max 100 µl) of intratumoraal (max 50 µl)

Einde experiment:

- Injecteren IV van CW-800 gelabelde antilichamen voor tumor visualisatie, max 100 µl via staartvene, 24h voor opofferen

- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uitsnemen van weefsels en serum *in vitro* analyse in het laboratorium.

Orthotoop vulva model:

Orthotope injectie van tumorcellen:

- Anesthesie onder geschikte anesthesie (isofluraan)
- Injectie van humane vulva tumor cellen in de vulva van de muis, 10 µl injectie per muis

Behandeling:

- IP injectie met neutraliserende antilichamen, maximaal 4x per week voor combinatie behandelingen en 2x per week voor monotherapie, maximaal 0.1 ml/10gr

Monitoren tumorgroei en bioluminescente imaging:

- IP injectie met maximaal 0.1 ml/10g luciferine
- Isofluraan anesthesie en imaging, maximaal 10 min per keer, maximaal 1 keer per week voor maximaal 10 weken
- Bloedafname via staartvene (maximaal 4 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)

Einde experiment:

- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uitsnemen van weefsels en serum voor *in vitro* analyse in het laboratorium

Optioneel: fluorescente imaging indien dit meer informatie verschaft over target lokalisatie/expressie:

- IV injectie van fluorescent gelabelde antilichamen, maximaal 100 µl in staartvene, 24h voor opofferen. Imaging in IVIS of PEARL imaging systeem onder isofluraan anesthesie, waarna de muis opgeofferd wordt.

Optioneel tumor resectie om effecten op metastasering na verwijderen primaire tumor te bekijken:

- Subcutane injectie met buprenorfine pre-operatief ter voorkoming van post-operatieve pijn, maximaal 0.1 ml/10gr lichaamsgewicht IP
- Geschikte anesthesie (Isofluraan) voor de duur van de operatie
- Chirurgische verwijderen van de primaire tumor, hechten van de wond
- Volgen van metastasering door middel van bioluminescente imaging (zie boven).

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

Darmkanker model:

Voor de tumor experimenten ligt de spreiding rond de 25%, het verwachte effect op tumorvolume is 35%, bij een power van 90% en een alpha van 0,05 wordt de groepsgrootte 11 muizen. Een experiment bestaat doorgaans uit twee controle groepen (positieve en negatieve) en 4 of 5 experimentele condities, zodat een tumor experiment uit 66 muizen bestaat. De tumortake in de modellen is minimaal 90% gebaseerd op voorgaande experimenten, waardoor aantal muizen (6 groepen, 10% uitval/geen tumortake) op 73 per experiment komt. Wij hebben de berekening voor het totale geschatte aantal berust op de aantallen die in de afgelopen jaren gebruikt zijn, gecombineerd met de hoeveelheid projecten dat de komende jaren gefinancierd is.

Het maximaal aantal experimenten dat uitgevoerd zal worden is 25 experimenten (combinatie therapieën maximaal 15 experimenten, resectie experimenten maximaal 10. Dit is gezien de vraagstelling van effectiviteit en beschikbare mankracht en middelen een reële schatting. Hierdoor komt de maximale totale hoeveelheid muizen op 1825.

Pancreastumor model:

Voor aanvang van een experiment wordt met behulp van power analyse bepaald wat de statistisch verantwoorde groepsgrootte is. Ervaring leert dat de spreiding 25% is, het verwachte effect 35%, bij een power van 90% en een alpha van 0,05 wordt de groepsgrootte dan 8 muizen. De tumortake in de modellen

is 95-100%.

Een experiment bestaat doorgaans uit maximaal 6 groepen, zodat een experiment uit 48 muizen bestaat. Wij hebben de berekening voor het geschatte aantal berust op de aantallen die in de afgelopen jaren gebruikt zijn, gecombineerd met de hoeveelheid projecten dat de komende jaren gefinancierd is, en de behandelingen die wij verwachten te gaan testen. Wij verwachten maximaal 20 experimenten te doen, waardoor het totaal op maximaal 980 dieren uitkomt

Vulvatumor model:

De groepsgroottes worden bepaald op basis van eerdere ervaringen met dit soort experimenten en powerberekeningen op basis van te verwachten verschillen en variatie. Onderstaand is een schatting gemaakt van het aantal noodzakelijke dieren om deze vragen te kunnen beantwoorden. De exacte statistische berekeningen worden gemaakt voorafgaand aan het experiment op basis van de meest up to date informatie. Wij verwachten op basis van eerdere experimenten 10 muizen per groep nodig te hebben. Tumortake in dit model is minimaal 90%. We gebruiken 2 histologisch verschillende cel lijnen om onze onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. Dit geeft 22 muizen per groep. We willen 10 (combinaties van) therapeutica testen, wat neerkomt op 220 muizen totaal.

Voor de tumor resecties verwachten wij uitval van maximaal 10%, waardoor we op 24 muizen per groep uitkomen, waarbij we dezelfde therapieën testen. Hierdoor komt dit op 240 muizen. De imaging experimenten kunnen we aan het einde van de lopende experimenten doen en daardoor zijn geen extra dieren nodig. In totaal verwachten wij dus maximaal 460 muizen nodig te hebben voor deze experimenten.

B. De dieren

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

Voor de darmkankermodellen zullen we gebruik maken van immunocompetente C57/Bl6 muizen (MC38), of Balb/c muizen (CT26 cellen). Voor het pancreas model zullen we gebruik maken van C57/Bl6 muizen (KPC cellen komen uit C57/Bl achtergrond) en voor het vulvatumor model van immunodeficiënte Balb/c nude muizen (human xenografts). Voor combinatiestudies [REDACTED] zijn immunocompetente muizen nodig en daarom modellen met muis tumorcellen. Om effecten op humane cellen te bestuderen mag er geen adaptieve immuunsysteem aanwezig zijn om afstoting te voorkomen. De muizen zullen afkomstig zijn van geregistreerde fokkers of eigen fok, wanneer knock-out van bepaalde receptoren (bijvoorbeeld Fc receptor KO) noodzakelijk is. Volwassen dieren van 6-12 weken oud zullen gebruikt worden, maximaal 3265 dieren, zoals hierboven gemotiveerd. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt voor de experimenten, uitgezonderd voor het vulva tumor model, waarbij alleen vrouwtjes gebruikt zullen worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: beoogde behandeling worden eerst uitvoerig getest *in vitro*. Alleen wanneer daar aanwijzingen zijn voor werkzaamheid zal te vertaling naar *in vivo* experimenten gemaakt worden. Aangezien we voornamelijk geïnteresseerd zijn in de interactie tussen tumorcellen en de daar omheen liggende steuncellen, is het cruciaal om het gehele organisme in ogenschouw te nemen. Voor deze experimenten worden alleen de meest kansrijke (combinatie) van compounds getest, zoals we dit *in vitro* hebben bepaald en op basis van eerdere dierexperimenten. De medicatie wordt getest in reguliere en 3-dimensionale

celkweekmodellen.

Vermindering: groepsgroottes zijn gebaseerd op eerdere experimenten en ervaring met dit model, waardoor een betere inschatting gemaakt kan worden van het benodigd aantal dieren. Na ieder experiment zal beoordeeld worden of de gebruikte behandeling genoeg effect laat zien voor vervolgonderzoek. Door gebruik te maken van endoscopische monitoring kunnen we het aantal dieren reduceren. Verder worden alleen muizen gebruikt met celspecifieke deleties waar we op basis van literatuur en eerdere experimenten voldoende aanleiding hebben om aan te nemen dat dit een cruciale rol kan spelen. Door het combineren van mono- met combinatietherapie kunnen dezelfde controlegroepen gebruikt worden binnen 1 experiment. Door de *in vivo* imaging is het niet nodig om muizen vroegtijdig op te offeren om tumorgroei te monitoren. Streng selectie van de therapeutica die in muizen getest worden heeft plaatsgevonden om het aantal dieren te verminderen. Na elk experiment wordt bekeken of de effecten sterk genoeg zijn om een vervolg te verantwoorden.

Verfijning: Personeel met veel technische ervaring met proefdieren en dit specifieke model zal de proeven uitvoeren. Door de imaging kunnen we tevens de muizen tijdig (bij grote tumoren of metastasen) uit het experiment halen voordat de dieren er veel last van krijgen. Door samenwerking met een groep die uitgebreide ervaring heeft met die model wordt kans op ongerief verminderd. Waar mogelijk wordt pijnbestrijding bij de muizen toegepast.

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

Elke individuele muis wordt minstens tweemaal per week nauwkeurig geobserveerd en gemonitord door de onderzoeker. Daarnaast worden de muizen standaard dagelijks bekeken door de proefdierversorgers, en eventuele onverwachte problemen worden direct doorgegeven aan de betreffende onderzoeker. Zo kan onverwacht lijden worden vastgesteld en onmiddellijk gestopt. Nadelige milieueffecten worden niet verwacht.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voor de operatie krijgen de muizen een buprenorfine injectie om de post-operatieve pijn te verminderen. Tijdens de imaging en endoscopie zijn de muizen onder anesthesie.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De muizen kunnen ongerief ondervinden van de injecties van therapeutica en de bloedafname, zoals stress. Ze ondervinden stress door desoriëntatie na het ontwaken uit de anesthesie en licht ongerief door de subcutane tumorgroei. Tumorgroei, alsmede metastase groei kan matig ongerief met zich meebrengen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De experimentele handelingen, behandeling, operatie, endoscopie, anesthesie.

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

Muizen die geopereerd worden krijgen pijnbestrijding en worden na de operatie dagelijks gemonitord tot de wond genezen is (4 tot 7 dagen) daarna worden ze minimaal tweemaal per week gemonitord.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Muizen zullen worden opgeofferd bij sterk gewichtsverlies in korte tijd (>10% in 2-3 dagen, of >20% tov start experiment) en aanhoudend rectaal bloedverlies of rectale prolapsen. Ook als de muizen duidelijke tekenen van ongerief vertonen (zoals moeizame ademhaling, lethargisch gedrag of slechte vachtconditie of ander sterk afwijkend gedrag) worden de dieren uit experiment genomen. **Groei van metastasen op basis van bioluminescente imaging wordt gemonitord en bij signaal boven de detectielimiet (indicatie voor grote metastasen) wordt het experiment beëindigd.**

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

Op basis van onze ervaring zal ongeveer 10% van de dieren de humane eindpunten halen voor het einde van het experiment.

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief geschat voor de verschillende modellen:

Subcutane donor muizen: licht ongerief (maximaal 100 muizen)

Orthotoop transplantatie modellen: matig ongerief

Orthotoop resectie model: matig ongerief

(Totaal matig ongerief maximaal 3165 dieren)

Orthotoop endoscopisch model: matig ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

De muizen worden gedood als onderdeel van het experiment om tumorvorming en -morfologie te kunnen analyseren

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

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

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11600	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Leids Universitair Medisch Centrum	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Subcutane tumor modellen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Subcutane tumormodellen hebben als voordeel dat ze een snelle methode zijn om de effectiviteit van therapieën te kunnen bepalen. Voordeel ten opzichte van de orthotope modellen is dat dit vaak sneller gaat en met minder ongerief voor de muizen omdat de tumorgroei eenvoudig gemonitord kan worden en er minder invasie optreedt. Verder is dit model geschikt om patient derived xenografts (PDX) te testen. Voordeel hiervan is dat de effectiviteit direct wordt getest op humane tumoren in muizen. Nadeel is de afwezigheid van een volwaardig immuunsysteem, waardoor deze component niet wordt meegenomen, in combinatie met de beperkte metastasering van subcutane modellen.

Primaire uitkomst parameters:

- Tumor groei of eradicatie
- Circulerende cytokines en immuuncellen uit bloed

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

Subcutane tumoren:

- Tumor inductie: muizen worden in de flank geïnjecteerd met tumorcellen, maximaal in 200 µl fysiologisch zoutoplossing.
- Behandeling: zodra er palpabele tumoren zijn wordt de behandeling gestart via IP, IV of subcutane injectie, maximaal 2x (monotherapie) of 4x per week (combinatie therapie) voor maximaal 10 weken. Voor combinatie therapie met [REDACTED] (IP, IV (max 100 µl) of intratumoraal (max 50 µl).
- Bloedafname via staartvene (maximaal 6 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname).
- Meten van de tumoren via palpatie en schuifmaat metingen, 2x per week.
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min

mogelijk ongerief, waarna uitnemen van weefsels en serum voor verdere analyse in het laboratorium

Patient derived xenografts:

- Onder geschikte anesthesie plaatsing stukjes humane tumor subcutaan.
- Hechten van de incisie.
- Behandeling, monsterafname en monitoren tumorgroei als boven beschreven.

Monsterafname en einde experiment voor beiden:

- Bloedafname via staartvene (maximaal 4 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uitnemen van weefsels en serum *in vitro* voor analyse in het laboratorium.

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

Op basis van eerdere experimenten en de geobserveerde verschillen (verwachting van 35% verschil met een variatie van 30%) verwachten wij op basis van power berekeningen experimenten te doen met maximaal 16 muizen per groep, aangezien we weinig uitval verwachten, maar wel variatie in tumorgrootte. Gemiddeld gezien zullen de experimenten uit 4 groepen (controle-monotherapie x 2-combinatietherapie) bestaan en verwachten wij voor het testen van onze mono – en combinatie therapieën 20 experimenten op basis van de tumormodellen van interesse en depletie van effectorcellen bij bewezen effectiviteit) uit te voeren. Totaal hebben we dan maximaal 1280 muizen nodig voor deze experimenten.

B. De dieren

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

Afhankelijk van de gekozen tumorcellen (KPC (muis pancreas) / MC38/CT26 (beide muis CRC) / patient derived xenografts) hebben we respectievelijk C57/Bl6, Balb/c of immunodeficiënte balb/c nude muizen nodig van 6-10 weken oud. Voor mechanistische studies kunnen specifieke knockout muizen nodig zijn. Zowel mannetje als vrouwtjes zullen gebruikt worden. Maximaal 1280 muizen zullen gebruikt worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Alle therapeutica zijn uitvoerig *in vitro* in 2 dimensionale en in 3 dimensionale organoid systemen getest en alleen de meest kansrijke combinaties zullen getest worden *in vivo*. **Aangezien we de interacties tussen verschillende celtypen willen onderzoeken is een volledig organisme noodzakelijk om processen zoals tumorgroei, inductie van angiogenese, recruitment van immuuncellen, activatie van fibroblasten te kunnen analyseren.**

Vermindering: Groepsgroottes zijn gebaseerd op eerdere experimenten en ervaring met dit model, waardoor een betere inschatting gemaakt kan worden van het benodigd aantal dieren. Na ieder experiment zal beoordeeld worden of de gebruikte behandeling genoeg effect laat zien voor vervolgonderzoek.

Verfijning: Personeel met veel technische ervaring met proefdieren en dit specifieke model zal de proeven uitvoeren waardoor het ongerief voor de dieren zo beperkt mogelijk blijft. Wanneer de tumor 1000 mm³ wordt de muis om de dag gemonitord om mogelijk ongerief voor te zijn.

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

Dieren worden nauwkeurig gemonitord en op het moment dat de tumoren groter dan 1.5 cm³ worden, worden ze de dieren uit experiment genomen. De muizen worden 2 maal per week gewogen en beoordeeld door de onderzoekers en dagelijks door de proefdiervverzorgers. Alle handelingen worden uitgevoerd door ervaren onderzoekers.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er kan bij de muizen stress optreden ten gevolge van de het hanteren van de dieren, het meten van de tumoren en toedienen van de behandeling.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaken zijn de aard van de (be-) handelingen.

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

Alle handelingen worden uitgevoerd door ervaren onderzoekers en het hanteren van de dieren wordt zoveel mogelijk beperkt.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het experiment wordt uitgevoerd met inachtneming van de code-of-practise kankeronderzoek. Bij sterk gewichtverlies (10-15% in korte tijd of meer als 20% tov start van het experiment worden de dieren uit experiment genomen. Ook als de muizen duidelijke tekenen van ongerief vertonen (zoals moeizame ademhaling, lethargisch gedrag of slechte vachtconditie), of als de tumor boven de 1500 mm³ is gegroeid worde de muizen uit experiment genomen. Als de tumor groter dan 1000 mm³ is wordt de muis om de dag gemeten, zodat de tumor nooit groter dan 1500 mm³ kan worden, overeenkomstig de Code of Practice kankeronderzoek in proefdieren.

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

In voorgaande experimenten bleek dat slecht een klein gedeelte van maximaal 5% deze eindpunten haalt.

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief van deze experimenten wordt ingeschat als gering.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Om de tumoren te verzamelen en histologisch te analyseren is dit noodzakelijk. Het in leven houden van dieren met tumoren geeft onnodig ongerief aan de dieren.

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

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

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	AVD116002015271	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Leids Universitair Medisch Centrum	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		4	Orthotoop, fibrose gerelateerd hepatocellulair kanker model

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In patiënten wordt vaak gezien dat leverfibrose kan leiden tot het hepatocellulair carcinoom. *In vitro* studies laten een rol zien voor de TGF- β pathway in dit proces. Vandaar dat we therapeutische interventies in het proces van fibrose naar maligne ontanding willen testen in dit model. Dit model is recent beschreven in Nature protocols (Reiberger et al Nat Prot 2015; vol 10, issue 8:1264-1274) en na injectie van de cellen in fibrotische achtergrond zeer representatief voor de humane pathogenese.

Primaire uitkomst parameters zijn:

- mate van fibrose op basis van histologische analyses en bloed analyses
- tumorgroei op basis van bioluminescentie

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

De dieren zullen de volgende behandelingen ondergaan:

- 12 weken CCL₄ toediening, 3 keer per week orale sondevoeding, 20% oplossing, maximaal 150 μ l per toediening voor het induceren van leverfibrose
- Bloedafname via de startvene, maximaal 4x met minimaal 1 week tussenposen, maximaal 25 μ l/keer om leverfunctie/mate van fibrose te bepalen dmv metingen van leverenzymen

Optioneel operatie en injectie van muis HCC cellen:

- subcutane injectie van pijnstilling (0.1 ml/10 gr lichaamsgewicht maximaal)
- Geschikte anesthesie
- Openen van de buikholte en injectie van 20 μ l HCC cellen/matrigel oplossing onder het leverkapsel

- Hechten van de muizen met oplosbaar hechtdraad

Optioneel imaging van HCC tumoren (wekelijks vanaf 2 weken na operatie):

- IP injectie met 0.1 ml/10gr luciferine oplossing wekelijks
- Geschikte anesthesie
- imaging van tumorcellen onder met behulp van bioluminescentie.

Behandeling:

- Maximaal 4x per week in geval van combinatietherapie, of 2 keer in geval van monotherapie, afhankelijk van de medicatie subcutane, IP (0.1 ml/10gr) of IV(maximaal 100 µl) toediening van medicatie of [REDACTED] (IP, IV (max 100 µl) of intratumoraal (max 50 µl), maximaal 10 weken na operatie.

Monsterafname en einde experiment:

- Bloedafname via staartvene (maximaal 4 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uittreken van weefsels en serum *in vitro* voor analyse in het laboratorium

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

Op basis van gepubliceerde data (Reiberger et al Nat Prot 2015; vol 10, issue 8:1264-1274) met dit model is een uitval van 5% te verwachten door de CCL4 behandeling en minimaal 90% tumor take. Omdat we inschatten 8 muizen per behandelde groep nodig te hebben om statistisch voldoende power te hebben, hebben we met de uitval 9 muizen per groep nodig. Aangezien we verschillende therapeutica in monotherapie en in combinatie willen testen verwachten we gemiddeld gezien 6 experimentele groepen per experiment te hebben en in totaal 15 experimenten uit te voeren. In totaal zouden we dan 831 muizen nodig hebben voor deze experimenten.

B. De dieren

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

Mannelijke C3H muizen van een geregistreerde leverancier, 4-5 weken oud, vanwege de transplantatie van de HCA3 cellen en de betere fibrotische respons in mannelijke muizen dan in vrouwtjes (Reiberger et al). Maximaal 831 muizen zullen gebruikt worden voor deze experimenten.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: De therapeutische antilichamen die getest worden in dit model zijn reeds uitvoerig getest *in vitro* in celweek modellen en in 3 dimensionale organoid modellen. Hierbij worden alleen de meest veelbelovende kandidaten verder getest *in vivo*. Verder zijn de modellen zo gekozen dat ze nauw aansluiten bij de klinische situatie.

Aangezien we de interacties tussen verschillende celtypen willen onderzoeken is een volledig organisme noodzakelijk om processen zoals tumorgroei, inductie van angiogenese, recruitment van immuuncellen, activatie van fibroblasten te kunnen analyseren.

Vermindering: Door de *in vivo* imaging hoeven we niet voor het einde van het experiment muizen op te offeren om tumorgroei te analyseren, waardoor minder muizen nodig zijn. Na elk experiment wordt bekeken of de effecten sterk genoeg zijn om een vervolg te verantwoorden.

Verfijning: De muizen ontvangen pijnstilling om de post-operatieve pijn te verminderen. Verder geeft het monitoren van tumorgroei ook een betere welzijnsbewaking van de muizen, aangezien we snelle groei en eventuele metastasen kunnen identificeren op basis van bioluminescentie.

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

De muizen worden uitsluitend behandeld door getraind en ervaren personeel. Het hanteren van de dieren wordt beperkt tot het strikt aantal noodzakelijke handelingen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

toegepast?
☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.
☒ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.
Er wordt pre-operatieve pijnbestrijding gegeven door buprenorfine injectie. Verder worden de operatie en imaging gedaan onder inhalatie anesthesie (isofluraan).
I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen
Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?
Door de behandelingen en het hanteren van de muizen kan stress optreden. Door de anesthesie kunnen de muizen gedesoriënteerd zijn, maar ten opzichte van injectie anesthesie is deze methode sneller en komen de muizen sneller bij. CCL4 toediening kan ook ongerief veroorzaken door het hepatotoxische effect.
Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.
De aard van de (be)handelingen.
Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.
De handelingen worden uitgevoerd door getraind en ervaren personeel. Verder worden de muizen nauwkeurig gemonitord door de proefdierversorgers en minimaal 2 keer per week door de onderzoekers.
J. Humane eindpunten
Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?
☐ Nee > Ga verder met vraag K.
☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.
Dit experiment wordt uitgevoerd in overeenstemming met de code-of-practice kankeronderzoek. De eindpunten die gehanteerd worden is sterk gewichtsverlies in korte tijd 10-15% in 2-3 dagen of meer als 20% tov start van het experiment. Ook als de muizen duidelijke tekenen van ongerief vertonen (zoals moeizame ademhaling, lethargisch gedrag of slechte vachtconditie of ander sterk afwijkend gedrag) worden de dieren uit experiment genomen. Groei van metastasen op basis van bioluminescente imaging wordt gemonitord en bij signaal boven de detectielimiet (indicatie voor grote metastasen) wordt het experiment beëindigd.
Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?
Wij verwachten dat ongeveer 20% van de dieren een van deze eindpunten gaan bereiken.
K. Classificatie van ongerief
Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.
Wij verwachten matig ongerief voor de dieren in dit experiment.
Einde experiment
L. Wijze van doden
Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?
☐ Nee
☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.
Om het lijden te verminderen van de dieren en om de tumoren te kunnen analyseren is het doden van de dieren essentieel.
Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?
☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	AVD116002015271	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Leids Universitair Medisch Centrum	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		5	Modellen voor experimentele metastasen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor de metastaserende fase van colorectale tumor progressie zijn weinig goede modellen beschikbaar. Vandaar dat er vaak gebruikt gemaakt wordt van modellen voor experimentele metastasen. Voor dikke darmkanker (CRC) is injectie van tumorcellen in de milt een vaak gebruikt model. Luciferase gelabelde cellen worden, al dan niet in combinatie met tumor-geassocieerde fibroblasten, in de milt geïnjecteerd en vormen metastasen in de lever, de plek waar dit bij patiënten met CRC ook vaak wordt waargenomen. Binnen deze experimenten willen we testen of we door het targetten van de TGF- β pathway voornamelijk door middel van neutraliserende antilichamen dit kunnen verminderen.

Primaire uitkomst parameters:

- Grootte en bioluminescentie signaal van de tumoren

Optioneel voor immunotherapie gerelateerde studies:

- ██████████ in bloed

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

Milt injecties:

- Geschikte anesthesie, openen van de huid en buikwand
- Injectie van tumorcellen in de milt, maximaal 50 μ l
- Hechten van buikwand en huid afzonderlijk

Behandelingen:

- Maximaal 4x per week (combinatie therapie) of 2x per week (monotherapie door IP, IV of subcutane injecties) afhankelijk van de te testen medicatie.

Monsterafname en einde experiment:

- Bloedafname via staartvene (maximaal 4 keer, minstens 2 dagen interval, maximaal 25 microliter per bloedafname)
- Euthanasie door middel van toegestane euthanasie methodes (cervicale dislocatie, CO₂) met zo min mogelijk ongerief, waarna uitnemen van weefsels en serum voor *in vitro* analyse in het laboratorium.

Imaging:

- IP injectie met luciferine (maximaal 0.1 ml/10 gr) en geschikte anesthesie, maximaal 4 weken, maximaal 2x/week om metastase groei te monitoren. Imaging 1 min, totale duur anesthesie maximaal 10 minuten.

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

Voor de experimenten verwachten wij een verschil van minimaal 30% met een variatie van 20%, waardoor we 10 muizen per groep nodig hebben. Wij verwachten maximaal 6 groepen per experiment te testen, ook doordat we combinaties van tumorcellen met tumor-geassocieerde fibroblasten willen testen. Omdat we effecten op humane cellen in xenografts en syngeneic voor de combinatie met immunotherapie willen testen (beide 5 experimenten) verwachten we maximaal 600 muizen nodig te hebben voor deze experimenten.

B. De dieren

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

8-10 weken oude balb/c nude muizen voor HT29 xenografts, en 8-10 weken oude C57/Bl6 voor syngeneic MC38 injecties, beide van geregistreerde leveranciers. Zowel mannetjes als vrouwtjes zijn geschikt voor deze experimenten. In totaal verwachten we maximaal 600 muizen te gebruiken.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Alle medicatie is van tevoren getest in vitro in 2 dimensionale migratie en invasie assays alsmede 3-dimensionale systemen, om de effecten op metastaserende cellen te kunnen inschatten voorafgaand aan muizenexperimenten. Omdat metastasering een complexe interplay is tussen verschillende tumor en host cellen in een volledig organisme nodig om dit proces na te kunnen bootsen.

Vermindering: Alleen de meest potente therapeutica worden getest in vivo. Door de selectie van de modellen is met een minimaal aantal dieren een goede voorspelling te maken voor de klinische effecten in patiënten. Na elk experiment wordt bekeken of de effecten sterk genoeg zijn om een vervolg te verantwoorden.

Verfijning: De dieren worden nauwkeurig gemonitord door de onderzoekers en diervverzorgers en bij

tekenen van ernstig ongerief uit experiment genomen om verder lijden te voorkomen. De imaging van de metastasen zorgt voor een goede inschatting van groei van metastases en mogelijk naderend ongerief.

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

Nauwkeurige monitoring door de proefdierverzorgers (dagelijks) en onderzoekers (tweemaal per week). Handelingen en operaties worden uitsluitend door getraind personeel uitgevoerd. Post-operatief worden de dieren in de eerste uren gemonitord om milt bloedingen te kunnen detecteren. Nadelige milieueffecten worden niet verwacht.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De groei van metastasen kan aanleiding geven tot pijn, al hebben we dit niet geobserveerd in eerdere experimenten. Omdat het moment niet ingeschat kan worden bij welke knockout en wanneer het ongerief kan optreden is pijnbestrijding niet mogelijk. Verder kunnen morfinomimetica de darm peristaltiek beïnvloeden en zijn NSAIDs vanwege hun bloedverdunnende en ontstekingsremmende werking niet te combineren met onze vragenstellingen. Mocht er tekenen van pijn optreden (zoals bol zitten en andere

kenmerken op te stellen in overleg met de IVD en dierenarts) worden de dieren conform de eindpunten uit experiment genomen.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Door het hanteren van de dieren en de anesthesie voor de wekelijkse imaging kunnen de dieren stress ondervinden. De injectie van de cellen in de milt kan aanleiding geven tot bloedingen. Mocht dit gebeuren en de bloeding niet te stelpen zijn wordt de muis uit experiment genomen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De aard van de behandelingen.

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

Handelingen worden uitsluitend door getraind personeel uitgevoerd en de frequentie wordt tot een minimum beperkt.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het experiment wordt uitgevoerd met inachtneming van de code-of-practice kankeronderzoek. Bij sterk gewichtverlies (10-15% in korte tijd of meer als 20% tov start van het experiment worden de dieren uit experiment genomen. Ook als de muizen duidelijke tekenen van ongerief vertonen (zoals moeizame ademhaling, lethargisch gedrag of slechte vachtconditie of ander sterk afwijkend gedrag) worden de dieren uit experiment genomen. **Groei van metastasen op basis van bioluminescente imaging wordt gemonitord en bij signaal boven de detectielimiet (indicatie voor grote metastasen) wordt het experiment beëindigd.**

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

Wij verwachten dat dit bij maximaal 10% van de dieren het geval zal zijn voor het einde van het experiment.

K. Classificatie van ongerief

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

Wij verwachten maximaal matig ongerief voor de dieren.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Vanwege de analyse van de ontstane metastasen en de voortdurende groei van de metastases, met ernstig ongerief mogelijk als gevolg.

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

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

☒ Ja

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD116002017858
2. Titel van het project: Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van de Transforming Growth Factor- β signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren.
3. Titel van de NTS: Identificeren van nieuwe therapeutische aangrijpingspunten om tumorgroei en uitzaaiingen te verminderen.
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC: 24-02-2017
 - ☒ aanvraag compleet: 24-02-2017
 - ☒ in vergadering besproken: 23-03-2017 en 13-04-2017
 - ☐ anderszins behandeld:
 - ☒ termijnonderbreking(en) van / tot: 04-04-2017 t/m 06-04-2017
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☒ aanpassing aanvraag: 06-04-2017
 - ☒ advies aan CCD: 20-04-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag 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
 - Datum: 04-04-2017
 - De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de titel, de go/no-go momenten, de motivatie voor de diersmodellen en de samenhang tussen deel 1 en deel 2.
 - Datum antwoord: 06-04-2017
Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlage en de NTS door de aanvrager aangepast.
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
 - N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. 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. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project is onderzoeken wat de rol is van de TGF- β signaaltransductieroute in initiatie, progressie en metastasering van solide tumoren en hoe hier therapeutisch op kan worden ingegrepen. Met als uiteindelijke doel het verkrijgen van aanknopingspunten voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingsstrategieën voor mensen met darm-, pancreas-, lever- of vulvatumoren. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en dat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat eerder onderzoek heeft laten zien dat liganden en receptoren uit de TGF- β familie, van groot belang zijn in de interacties tussen verschillende celtypen in tumoren en kunnen leiden tot verhoogde invasiviteit en tumor metastasering. Maar het is nog niet bekend hoe deze interacties tot stand komen. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op fundamenteel onderzoeken hoe de TGF- β familie bijdraagt aan de interacties tussen epitheliale tumor cellen en het tumor stroma en hoe dit de progressie en metastasering van tumoren beïnvloedt zijn de proefdieren, de onderzoekers, de patiënten en de samenleving.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en

gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: de nieuwe therapeutische benaderingen hebben minder bijwerkingen, waardoor de kwaliteit van leven van deze patiënten verhoogd wordt.

Waarden die voor de samenleving bevorderd worden: nieuwe behandelingsstrategieën voor mensen met darm-, pancreas-, lever- of vulvatumoren kunnen wereldwijd een grote positieve impact hebben op de maatschappij door het afnemen van de mortaliteit- & morbiditeitsgraad en enorme ziektekosten.

6. Nadelige milieueffecten zijn alleen te verwachten wanneer gebruik wordt gemaakt van azoxymethaan omdat dit een schadelijk middel is voor mens en dier. Dit middel wordt echter alleen door ervaren personeel toegediend in een hiervoor geschikte zuurkast. Na toediening van het middel zullen de muizen voor minstens drie dagen in onderdruk worden gehuisvest in afzonderlijke IVC's. Al het materiaal afkomstig van deze dieren zal de eerste drie dagen op een gecontroleerde wijze afzonderlijk worden afgevoerd. Hierna is er geen risico meer voor schade aan mens of dier.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek en geavanceerde orthotopische modellen met mogelijkheden voor bioluminescentie imaging. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald resulterend in een aantal proefschriften en een groot aantal publicaties in gerenommeerde wetenschappelijke tijdschriften. Daarnaast zijn er belangrijke subsidies voor dit onderzoek binnen gehaald.
8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstelling en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwefdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De dieren die spontaan tumoren ontwikkelen of

subcutane tumoren hebben ondervinden maximaal mild ongerief. De dieren met chemisch geïnduceerde tumoren, orthotope tumoren of metastasen ondervinden cumulatief maximaal matig ongerief vanwege de toediening van azoxymethaan, DSS of CCL4 en de groei van tumoren en metastasen. De inschatting van de DEC is in overeenstemming met het niveau van cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch zijn veranderd. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project zullen er tumoren ontstaan die de dieren beperken in hun bewegingsvrijheid en hun natuurlijke gedrag.
13. Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diersmodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diersmodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende diersproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Zo worden de hypothesen eerst *in vitro* getoetst door middel van 2D en 3D celkweek experimenten, voordat een experiment met transgene muizen van start gaat. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van diersproeven. De onderzoeksgroep heeft jarenlange ervaring met dit soort experimenten. Bovendien beschikt de onderzoeksgroep over een team van biotechnici die de benodigde ervaring hebben met proefdiersonderzoek. Tevens wordt door het gebruik van endoscopisch monitoring alsmede het combineren van controlegroepen het totaal aantal benodigde dieren voor de beschreven experimenten verminderd. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van diersproeven en is zo opgezet dat de diersproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. Door het gebruik van *in vivo* imaging kan de tumorgroei zeer nauwkeurig worden gemonitord waardoor overbodig ongerief wordt voorkomen. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven diersproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Voor de meeste experimenten wordt gebruik gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. Voor het vulva model worden uiteraard alleen vrouwelijke dieren gebruikt en voor het hepatocellulair kanker model alleen mannelijke dieren. De onderzoeker heeft dit naar mening van de DEC voldoende onderbouwd in de projectaanvraag.
19. De dieren worden na afloop van het experiment gedood om het materiaal voor

analyses te kunnen isoleren en om verder ongerief te beperken. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

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. Rechtvaardigt het onderzoek naar de rol van de TGF- β signaaltransductieroute in initiatie, progressie en metastasering van solide tumoren en hoe hier therapeutisch op kan worden ingegrepen, met als uiteindelijke doel het ontwikkelen van nieuwe behandelingsstrategieën voor mensen met darm-, pancreas-, lever- of vulvatumoren. het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?
2. Project gericht op het verkrijgen van fundamentele nieuwe inzichten in de rol van de TGF- β familie in tumor initiatie en progressie, wat toekomstig vertaald kan worden naar klinische toepassingen.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de doelgroep (incl. de maatschappij) bevorderd worden: groot voordeel.
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Kanker is een van de belangrijkste doodsoorzaken in de westerse wereld en de incidentie neemt nog steeds toe. Pancreas-, darm-, lever- en vulvatumoren komende minder vaak voor maar worden gekenmerkt door een slechte prognose en slechte kwaliteit van leven voor patiënten. Het merendeel van de patiënten overlijdt ten gevolge van metastasering van de tumoren. Huidige therapieën berusten vaak op chirurgische verwijdering van de tumor, al dan niet aangevuld met chemotherapie of bestraling, maar gaan gepaard met veel bijwerkingen. Ondanks dat eerder onderzoek heeft aangetoond dat liganden en receptoren uit de TGF- β familie van groot belang zijn in de interacties tussen verschillende celtypen in tumoren, is er nog veel onbekend over hoe deze interacties tot stand komen. de DEC acht het verkrijgen van fundamentele kennis over hoe TGF- β receptoren de initiatie en progressie van tumoren beïnvloeden van essentieel belang om een duidelijk beeld te kunnen vormen over de in de kliniek te verwachten therapeutische effecten van anti-TGF- β therapie en de meest kansrijke combinaties van medicatie om in klinische trials te onderzoeken. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en

dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief (terminaal) bij de dieren gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

✓ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - ☐ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - ☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel is het volgende knelpunt naar voren gekomen: Het betreft een erg complexe aanvraag met een voornamelijk exploratief karakter. Er is in de DEC gediscussieerd over de samenhang van de subdoelen en of men hier voldoende informatie uit kan halen. Op basis van de wetenschappelijke inhoud heeft de DEC geconcludeerd dat de onderzoeksvragen door middel van de beschreven subdoelen beantwoord kunnen worden. De DEC adviseert de vergunning te verlenen mits de uitvoering van de experimenten onder strakke regie van de IvD plaatsvindt.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden
Dhr. Leids Universitair Medisch Centrum
Postbus 9600
2300 RC LEIDEN


**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
AVD116002017858
Bijlagen
2

Datum 11 mei 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 mei 2017. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van elementen van de Transforming Growth Factor-R signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD116002017858. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

11 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD116002017858

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
11 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017858

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11600
Naam instelling of organisatie: Academisch Ziekenhuis Leiden
KvK-nummer: 27366422
Straat en huisnummer: Albinusdreef 2
Postbus: 9600
Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN
IBAN: NLIIDEUTQ451001400
Tenaamstelling van het rekeningnummer: LUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



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

Datum:

11 mei 2017

Aanvraagnummer:

DEC16002017858

Over uw project

Geplande startdatum:

1 augustus 2017

Geplande einddatum:

1 augustus 2022

Titel project:

Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van elementen van de Transforming Growth Factor-R signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren

Titel niet-technische samenvatting:

Identificeren van nieuwe therapeutische aangrijpingspunten om tumor groei en uitzaaiingen te verminderen

Naam DEC:

DEC Leiden

Postadres DEC:

Postbus 9600 [REDACTED] LUMC 2300 RC Leiden

E-mailadres DEC:

[REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.827,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

Gemandateerd vergunninghouder

Plaats:

Gemandateerd vergunninghouder

Datum:

8 mei 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden
Leids Universitair Medisch Centrum
Postbus 9600
2300 RC LEIDEN


**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
AVD116002017858
Bijlagen
2

Datum 11 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 11 mei 2017
Vervaldatum: 10 juni 2017
Factuurnummer: 170858

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD116002017858	€ 1.827,00

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.

Geachte [REDACTED]

Hartelijke dank voor de evaluatie van onze aanvraag. We hebben uw vragen onderstaand beantwoord en de documenten overeenkomstig aangepast. De wijzigingen zijn hierbij in **rood** aangegeven.

-U geeft in uw aanvraag aan meerdere onderzoeksvragen te gaan onderzoeken ten behoeve van twee verschillende doelstelling.

Dat is correct, maar de experimenten die vereist zijn om deze 2 doelstellingen te kunnen bereiken vertonen veel overlap. Een voorbeeld daarvan is het volgende: als we de therapeutische efficiency testen van een [REDACTED] neutraliserend antilichaam, zoals we dat in eerdere gepubliceerde studies hebben gedaan, is een van de belangrijke controles om een (celtype specifiek) knockout dier te gebruiken. Dat zou een studie op zich kunnen zijn, maar deze dieren leveren ook directe informatie mbt doelstelling 1, want we leren meer over wat [REDACTED] doet op deze specifieke cellen. Hierdoor is de hoeveelheid dieren die we nodig hebben minder, aangezien we deze vraagstellingen kunnen combineren in 1 experiment. Vandaar dat wij van mening zijn dat beide doelstellingen vallen onder 1 centrale vraag en dat combineren belangrijk voordeel oplevert, zowel wetenschappelijk als ethisch, aangezien minder dieren noodzakelijk zijn. We hebben in onze schattingen van het aantal te gebruiken dieren hier al rekening mee gehouden.

U geeft bovendien aan dat er sprake is van een gefaseerde uitvoering. Uit uw aanvraag wordt de fasering echter niet geheel duidelijk. In de in het projectvoorstel opgenomen flowchart 1 geeft u bijvoorbeeld aan dat afhankelijk van de respons cellen gedepleteerd worden, neutraliserende antilichamen gebruikt worden en dat er transplantatie studies worden uitgevoerd. Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk of deze 3 type experimenten parallel zullen worden uitgevoerd of dat ook hier fasering in wordt aangebracht.

Deze studies zullen niet parallel plaatsvinden en hoogstwaarschijnlijk zal slechts 1 van de methodes gebruikt worden (tenzij dit geen sluitend bewijs oplevert). Afhankelijk van het fenotype dat we observeren zullen we kiezen voor 1 van de mogelijkheden. Stel we zien dat een bepaald effectortype cel een belangrijke rol lijkt te spelen (bijv verhoogde [REDACTED] infiltratie na celtype specifieke deletie van een receptor) zullen we [REDACTED] depletieren in een vervollexperiment. Daarentegen als we een upregulatie van [REDACTED] zien, zullen we neutraliserende antilichamen tegen [REDACTED] gebruiken etc. We zullen de keuze vooraf met de IVD bespreken en met eerdere resultaten onderbouwen.

Hetzelfde geldt voor de in het projectvoorstel opgenomen flowchart 2 waarin u aangeeft dat afhankelijk van de respons cellen gedepleteerd worden, er gebruik gemaakt zal worden van knockout muizen en dat er transplantatie studies worden uitgevoerd.

Hier geldt eigenlijk hetzelfde voor als hierboven beschreven. In het geval dat we therapeutische activiteit zien van een antilichaam dat een immuun [REDACTED] reactie kan opwekken, is een belangrijke vervolgstap om de effectorcellen te depletieren en te onderzoeken of daarmee het therapeutische effect verdwijnt. Dit geeft veel informatie over het onderliggende mechanisme en geeft wederom aan dat de twee doelstellingen van dit project sterk onderling verbonden zijn. Dus ook hier zullen de depletie-transplantatie- of knockout studies niet parallel plaatsvinden en in overleg met de IVD gepland worden.

Tot slot geldt dit ook voor de experimenten waarin combinatietherapie getest wordt. Worden experimenten met [REDACTED] parallel of gefaseerd uitgevoerd? U wordt verzocht dit toe te lichten. Indien er sprake is van fasering wordt u ook verzocht toe te lichten op basis van welke criteria besloten zal worden en vervollexperiment te starten.

De combinatiestudies kunnen wel parallel uitgevoerd worden, aangezien het mechanisme waarop synergie verwacht wordt bij combinatie met [REDACTED] anders is en beide andere informatie gaat verschaffen. [REDACTED]

[REDACTED] De experimenten die verder beschreven staan (depletie-transplantatie-knockout) geldt hetzelfde als boven, die worden niet parallel uitgevoerd, maar gebaseerd op de bevindingen wordt de beste methode gekozen om het bewijs sluitend te krijgen.

-Het is daarnaast niet voldoende duidelijk op basis van welke criteria besloten wordt een bepaald type experiment wel/niet uit te voeren. U wordt verzocht de keuzemomenten en de criteria op basis waarvan besluiten worden genomen te beschrijven. Het gaat hierbij om zowel de keuzemomenten binnen als tussen de twee doelstellingen. U wordt verzocht in elk geval in te gaan op de volgende keuzemomenten:

De twee doelstellingen vinden niet parallel plaats voor 1 target, maar op basis van bevindingen uit doelstelling-1 of eerdere bevindingen worden therapeutische studies in doelstelling-2 gestart. Dat is een doorlopend proces en deels een vervolg van de lopende projecten op onze afdeling. Binnen een doelstelling is onze primaire focus nu op [REDACTED] maar anderen kunnen noodzakelijk zijn, zoals hieronder beargumenteerd. We zullen de argumentatie voor de keuzes altijd eerst aan de IVD voorleggen alvorens de experimenten te starten.

-Selectiecriteria voor specifieke TGFβ receptoren en liganden

We gaan in eerste instantie kijken naar [REDACTED] op basis van de bevindingen in de huidige lopende experimenten. Aangezien deze receptoren deel uitmaken van de TGFβ familie, waarin 7 type-I, 4 type-II en 2 coreceptoren beschreven zijn, die allemaal in verschillende receptor complexen voor kunnen komen, kunnen we niet exact aangeven welke andere receptor, of op welk celtype, we die moeten uitknocken om onze doelstelling te kunnen behalen. Dit zal dus bepaald moeten worden op basis van de bevindingen uit de afgeronde experimenten. Ter achtergrond; er verschijnen dagelijks 11 artikelen over de TGF-β superfamily, wat de complexiteit van dit onderzoek aangeeft. We zullen de keuze beargumenteerd aan de IVD voorleggen.

-Selectiecriteria voor specifieke therapieën (zowel mono als combinatie)

De monotherapie zullen we slechts testen als we duidelijke aanwijzingen hebben op basis van expressiepatroon en rol in tumorprogressie en metastasering (humane samples, huidige experimenten en/of bevindingen uit doelstelling-1). Zoals aangegeven in de flowchart zullen we combinatie-therapieën slechts testen bij milde tot gemiddelde respons op de monotherapie. Bij sterke respons is geen combinatie nodig en wordt dit niet getest.

-Keuze voor orthotopie en subcutane modellen

Deze keuze is gebaseerd op de specifieke vraagstelling. Wanneer we kijken naar interactie met host cellen (bijvoorbeeld fibroblasten) zijn orthotopie modellen noodzakelijk. Wanneer we een het effect op primaire epitheliale tumorgroei willen bekijken of bijvoorbeeld immuuninfiltratie is een model dat eenvoudig en met weinig ongerief te volgen is (subcutaan) een goede keuze.

-Keuze voor specifieke tumoren

Op dit moment hebben we projecten lopen om te kijken naar de TGFβ receptoren en liganden in darm- en pancreastumoren en zijn we recent gestart met een project naar levertumoren. In al deze projecten bestuderen we receptoren uit dezelfde familie, maar zijn de experimenten in verschillende fasen van onderzoek.

-Keuze uitvoering orthotopie resectie modellen

Deze modellen zullen we uitsluitend gebruiken wanneer we willen kijken naar de effecten van adjuvante behandeling en metastasering, wanneer dit onvoldoende plaatsvindt als de primaire tumor nog aanwezig is. We zullen dit voorafgaand met de IVD overleggen.

-Keuze experimenten fibrose inductie

Deze experimenten vinden plaats zodra wij overtuigend bewijs hebben *in vitro* en in patiënten of eerder verkregen muisweefsel dat de receptor waar we interesse in hebben (bijvoorbeeld [REDACTED]) verhoogd tot expressie komt in leverfibrose, en daarmee het voorstadium van hepatocellulaire tumoren.

-Keuze voor experimenten met levermetastasen

Deze experimenten worden alleen uitgevoerd om de directe effecten van een ligand of receptor te bekijken op engraftment in de lever, en dus niet de andere fasen van metastasering zoals intra- en extravasatie en overleving in de circulatie.

Het gaat hier dus niet om een onderbouwing van de keuze voor specifieke type experimenten, maar om de onderbouwing op basis waarvan u besluit dergelijke experimenten daadwerkelijk uit te voeren en op basis waarvan u bepaalt hoe deze uitgevoerd gaan worden. Indien er sprake is van fasering in de uitvoering wordt u verzocht dit ook aan te geven.

-Uit uw aanvraag (bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2) wordt niet duidelijk hoeveel dieren licht en hoeveel dieren matig ongerief ondergaan. U wordt verzocht dit te specificeren.

Voor bijlage-1 is toegevoegd dat 825 muizen licht en 825 muizen maximaal matig ongerief ondergaan. Voor bijlage-2 is dat 100 muizen licht ongerief en 3165 muizen maximaal matig ongerief.

-U geeft aan in bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.5 geen pijnbestrijding te kunnen toepassen, terwijl dieren wel pijn kunnen ondergaan. U geeft aan dieren die pijn ervaren uit de proef te halen volgens de humane eindpunten. Het is onduidelijk hoe lang de dieren dan pijn zullen ervaren voordat de dieren gedood zullen worden. U wordt verzocht dit toe te lichten.

In onze eerdere experimenten hebben we geen tekenen van pijn bij de muizen waargenomen, maar wij kunnen dat het optreden van pijn ten gevolge van de ontsteking of groei van metastasen niet op voorhand uitsluiten. Daartoe worden de muizen gedurende de DSS cycli dagelijks gemonitord (gewicht en algemene conditie, tekenen van pijn zoals met bolle rug zitten) en daarna minimaal 2 keer per week. Op basis van eerdere experimenten met de metastase modellen verwachten we geen pijn voordat het experiment afgerond is, maar kunnen dit ook hier niet uitsluiten. Daarom monitoren wij toch met behulp van een score om signalen van pijn op tijd te kunnen herkennen (in overleg met IvD en dierenarts). Bij iedere uiting van pijn zullen wij het experiment beëindigen voor dat dier. Buiten dat worden de dieren dagelijks gecontroleerd door de dierversorgers en de onderzoeker wordt op de hoogte gebracht wanneer de dieren afwijkend gedrag vertonen.

In bijlage 3.4.4.1 geeft u wel een onderbouwing waarom pijnbestrijding niet mogelijk is. Een dergelijke onderbouwing ontbreekt in bijlage 3.4.4.5. U wordt verzocht deze onderbouwing alsnog te geven.

De argumentatie is toegevoegd in bijlage-5.

-In bijlagen 3.4.4.3, 3.4.4.4 en 3.4.4.5 wordt bij de vraag over de 3V's niet toegelicht waarom de doelstellingen niet behaald kunnen worden zonder het gebruik van proefdieren. U wordt verzocht deze informatie alsnog in de desbetreffende bijlagen op te nemen.

Deze informatie is opgenomen in de betreffende bijlagen.

-Door de aanvraag heen worden verschillende criteria voor humane eindpunten benoemd die niet worden beschreven bij de vraag over de humane eindpunten. U wordt, voor de volledigheid en navolgbaarheid, verzocht te vragen over de humane eindpunten daarmee aan te vullen.

We hebben de overige criteria die gebruikt worden om het experiment te monitoren of aan te passen tevens opgenomen in de humane eindpunten.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden
Dhr. Leids Universitair Medisch Centrum
Postbus 9600
2300 RC LEIDEN



**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
AVD116002017858
Bijlagen
1

Datum 3 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer ,

Op 11 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van elementen van de Transforming Growth Factor-R signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren" met aanvraagnummer AVD116002017858. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 15 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u uw doelstelling, gefaseerde uitvoering, go- no go criteria, selectiecriteria, keuzemomenten, ongeriefsclassificatie, pijn bij de dieren en afwezigheid van pijnbestrijding, vervanging en humane eindpunten verduidelijkt.

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.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van elementen van de Transforming Growth Factor-R signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning niet voor langer dan 5 jaar mag worden afgegeven.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 11 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Datum:

3 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD116002017858

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Datum:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017858

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academisch Ziekenhuis Leiden

Adres: Postbus 9600

Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN

Deelnemersnummer: 11600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022, voor het project "Onderzoek naar de rol en therapeutische potentie van elementen van de Transforming Growth Factor-R signaaltransductie route in progressie en metastasering van solide tumoren" met aanvraagnummer AVD116002017858, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. 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 11 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 11 mei 2017, ontvangen op 11 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 15 juni 2017

Aanvraagnummer:
AVD116002017858

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Spontane en chemisch geïnduceerde tumor modellen				
	Muizen (Mus musculus) /	1.650	50% Matig 50% Licht	
3.4.4.2. Orthotope tumormodellen				
	Muizen (Mus musculus) /	3.265	97% Matig 3% Licht	
3.4.4.3. Subcutane tumor modellen				
	Muizen (Mus musculus) /	1.280	100% Licht	
3.4.4.4. Orthotoop, fibrose gerelateerd hepatocellulair kanker model				
	Muizen (Mus musculus) /	831	100% Matig	
3.4.4.5. Modellen voor experimentele metastasen				
	Muizen (Mus musculus) /	600	100% Matig	

Voorwaarden

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

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

Aanvraagnummer:
AVD116002017858

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:
AVD116002017858

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:
AVD116002017858

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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