

Inventaris Wob-verzoek W17-09									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017984								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x		x	x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Vraag en antwoord aanvulling				x		x	x	
8	Verzoek nieuwe niet-technische samenvatting				x		x	x	
9	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	



15 MAART 2017

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	<p>Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i></p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Ja &gt; Vul uw deelnemernummer in 10700 <input type="checkbox"/> Nee &gt; U kunt geen aanvraag doen</p>																
1.2	<p>Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.</p>	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Universiteit Maastricht</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">KvK-nummer</td> <td>50169181</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Straat en huisnummer</td> <td>Minderbroedersberg 4-6</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Postbus</td> <td>616</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Postcode en plaats</td> <td>6200 MD Maastricht</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">IBAN</td> <td>NL04 INGB 0679 5101 68</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Universiteit Maastricht</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	50169181	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6	Postbus	616	Postcode en plaats	6200 MD Maastricht	IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																	
KvK-nummer	50169181																	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg 4-6																	
Postbus	616																	
Postcode en plaats	6200 MD Maastricht																	
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																	
1.3	<p>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></p>	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="5" style="background-color: black; width: 200px;">[Redacted]</td> <td style="text-align: right;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Functie</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Afdeling</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Telefoonnummer</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">E-mailadres</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Afdeling	Telefoonnummer	E-mailadres									
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		
1.4	<p>Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="5" style="background-color: black; width: 200px;">[Redacted]</td> <td style="text-align: right;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Functie</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Afdeling</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Telefoonnummer</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">E-mailadres</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Afdeling	Telefoonnummer	E-mailadres									
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		
1.5	<p><i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td rowspan="5" style="background-color: black; width: 200px;">[Redacted]</td> <td style="text-align: right;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Functie</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Afdeling</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">Telefoonnummer</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding-right: 5px;">E-mailadres</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	Afdeling	Telefoonnummer	E-mailadres									
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 15 - 3 - 2017
- Einddatum 15 - 3 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Targeting Oxygen Metabolism to Improve Glioblastoma outcome
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Verbeteren van de behandeling van hersenkanker door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-UM
- Postadres Postbus 616, 6200 MD Maastricht
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 568 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**

**Plaats**

Maastricht

**Datum**

1 - 3 - 2017

**Handtekening**





## Form Project proposal

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

### 1 General information

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

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

## **Motivation**

### **Glioblastoma multiforme (GBM)**

GBM is the most common and malignant adult brain tumor. Newly diagnosed GBM patients have a median survival of 15 months and standard treatment consists of surgery, radiotherapy (RT) and adjuvant temozolomide (TMZ) <sup>1</sup>. Glioblastomas are highly resistant to radiation and acquired resistance to chemotherapy is invariably associated with recurrence. Treatment failure leads to a high mortality rate in GBM patients and prolonging survival and treatment response is a high priority. **What currently is lacking are alternative treatments that can complement standard of care to improve survival.**

### **Tumor hypoxia in GBM**

Normal tissues maintain a balance between growth, proliferation and oxygen supply. This balance is altered during solid tumor growth where focal regions of low oxygen (hypoxia) arise and tumor growth disrupts normal vascular perfusion <sup>2</sup>. Tumor hypoxia is driver of tumor angiogenesis, a hallmark of most locally advanced tumors and is associated with a diminished therapeutic response, malignant progression and poor survival <sup>3</sup>. Histologically GBM is characterized by extensive angiogenesis, diffuse micro-infiltration and invasion and necrosis. Extensive hypoxia is frequent in GBM and a negative prognostic factor associated with high grade, a shorter time to recurrence and reduced survival <sup>4,5</sup>.

### **Tumor heterogeneity; driver of progression and treatment failure**

It is well recognized that biological heterogeneity is key for solid cancer progression and cause of variability in treatment response <sup>6</sup>. Tumor heterogeneity is caused by stochastic mutations in tumor subpopulations as well as through their interaction and response to changes in the tumor microenvironment. One important cause of intratumor heterogeneity is the existence of tumor cells with stem-like characteristics or cancer stem cells (CSC) that retain self-renewal and differentiating capacity. CSCs have significant therapeutic implications as they are tumor initiating <sup>7</sup> and correlate with tumor grade and relapse <sup>8</sup>. Clonogenic survival after RT and chemotherapy is predictive for local control and caused by Cancer Stem cells (CSC) that must be eliminated to achieve durable responses and cure <sup>9</sup>. Factors which contribute to their intrinsic resistance include efficient DNA repair, scavenging of ROS, slow proliferation or cell cycle redistribution, rapid repopulation after treatment and multi-drug resistant phenotypes among others. Evidence suggest that normal stem cells and their tumorigenic counterparts reside in hypoxic niches which maintain their self-renewal programs. In primary GBM so called glioma stem cells (GSC) have been identified which are highly tumorigenic and treatment resistant <sup>10</sup> and behave as stem cells *in vitro* <sup>11-13</sup>. *In vivo* they reside in hypoxic areas, depend on glycolysis <sup>14,15</sup> and are preferentially expanded under hypoxia <sup>16,17</sup>. Blocking hypoxia signalling in tumors blocks self-renewal and survival of GSC cells and attenuates tumor formation <sup>14,18</sup>.

### **Hypoxic adaptation increased malignancy and resistance to treatment**

Mammalian cells adapt to hypoxia by activating the UPR and mTOR kinase pathway <sup>19 20</sup> and activation of the O<sub>2</sub>-labile Hypoxia Inducible transcription Factor (HIF), which drive a complex gene program involved in the adaptation of tumor cells to hypoxic stress <sup>21</sup>. HIF is composed of a constitutively expressed HIF1 $\beta$  subunit and an O<sub>2</sub>-regulated HIF1 $\alpha$  subunit, which is hydroxylated under aerobic conditions by O<sub>2</sub>-dependent prolyl hydroxylase domain proteins (PHDs). Under hypoxic conditions, PHD activity attenuates, HIF1 $\alpha$  accumulates, and forms a heterodimer with HIF1 $\beta$  and induces transcriptional activation of specific target genes. The HIF transcriptional program is complex and induces metabolic adaptations to altered O<sub>2</sub> and nutrient supply, and induces pivotal oncogenic processes. Hypoxia also increases expression of glucose transporters and glycolytic enzymes and facilitates ATP production from glycolysis and suppresses ROS <sup>22,23</sup>. HIF activation is frequently observed in cancers and is a prognostic factor for poor outcome <sup>3</sup>.

### **Hypoxia predictive factor**

Intratumoral hypoxia has been shown to decrease therapeutic efficacy of RT and chemotherapy <sup>24</sup>. Hypoxic tumor cells are genetically unstable and show increased MGMT expression and thereby resistance to alkylating TMZ chemotherapy <sup>25</sup>. Furthermore hypoxic tumors are poorly perfused with increased interstitial pressure and altered drug transport and metabolism which contribute to chemo-resistance. Furthermore, hypoxic cells are 2-3 fold more resistant to killing than oxic cells. Our work has demonstrated that hypoxia also activates pro-survival programs by activating autophagy and thereby influencing treatment resistance <sup>19</sup>. On the contrary, treatment also causes tumour reoxygenation leading to increased levels of ROS activating



HIF1 $\alpha$  which activates vascular endothelial growth factor A (VEGFA) production, leading to the formation of abnormal vessels contributing to tumor hypoxia. Thus hypoxia and treatment seem to be in a catch22 for treatment failure.

#### **Targeting hypoxia in tumors**

Hypoxia is a high priority therapeutic target that has yet to be fully exploited in GBM. Pre-treatment oxygenation of tumors is prognostic and predictive for RT response in head and neck squamous carcinoma and hypoxic gene classifiers can be used to predict prognosis<sup>26</sup>. Three main approaches targeting tumor hypoxia can be distinguished; improving tumor oxygenation, hypoxic radiosensitization and elimination of hypoxic cancer cells.

While hypoxic modification treatments have been around for many decades only few clinical successes have been achieved mainly in head and neck cancer<sup>27</sup>. This has been attributed to poor tumor penetration, low potency at tolerable doses, unacceptable toxicity at high doses, normal tissue effects due to bystander effect or normoxic activation, non-standardized treatments between centres and lack of patient selection using biomarkers of hypoxia response. The road from preclinical to clinical implementation is difficult and very expensive and the identification and testing of new classes of hypoxia modifying drugs and their clinical benefit may take many years.

**Based on the theoretical background of tumor hypoxia as a key-contributor to RT and chemotherapy resistance and increased malignant behaviour in GBM, we are intrigued by the notion that currently available FDA approved lipid lowering drugs may also affect tumor O<sub>2</sub>-consumption. Drug repurposing would provide us with excellent candidates to advance the therapeutic potential of hypoxia modification in human tumors and specifically GBM.**

#### **Reducing oxygen consumption for hypoxic modification in GBM**

An alternative strategy to target tumor hypoxia, which is the key-concept in this work plan, is to reduce O<sub>2</sub> consumption in tumors cells making them less hypoxic. Mitochondrial respiration is responsible for 70–90% of total oxygen consumption and reducing mitochondrial function can have a major effect to balance supply and demand. While in normal cells mitochondrial respiration accounts for more than 90% of ATP production in tumors this balance is shifted to 50% from oxidative phosphorylation and 50% from glycolysis. Genetic analysis of tumors has identified oncogenic changes (i.e Myc, Tp53, AKT) that have been shown to contribute to this different tumor metabolism. For example as previously described, recent work has shown that HIF1 actively increases glycolysis and decreases mitochondrial function for metabolic reduction of oxygen demand<sup>23</sup>.

#### **Prolyl hydroxylases, Fenofibrates and Statins**

Changing oxygen demand by interfering with oxidative phosphorylation seems theoretically a promising method in modifying tumor hypoxia. There is strong theoretical evidence that reducing oxygen consumption by as little as 30% is several fold more effective in reducing the hypoxic fraction (HF) of tumors than increasing vascular flow<sup>28</sup>. Indeed tumors with reduced mitochondria and O<sub>2</sub> consumption are less hypoxic and more radiosensitive<sup>29</sup>. Recently this has also gained clinical support by the finding that anti-diabetic metformin reduces tumor hypoxia by blocking oxidative phosphorylation which is associated with decreased cancer incidence and improved response to RT<sup>30</sup>. Whether the pharmacodynamics and kinetics of metformin in patients also enable efficient mitochondrial inhibition in GBM, is unknown. Notwithstanding, these results illustrate the potential for repurposing FDA approved medication for cancer treatment, specifically those which also reduce tumor hypoxia.

**Prolyl hydroxylases** are dioxygenases that regulate the stability of HIFs in an O<sub>2</sub>-dependent manner. Muscle cells targeted for PHD1 loss show reduced O<sub>2</sub> consumption and reprogramming to aerobic glycolysis protecting them from ROS induced damage under ischemic conditions<sup>31</sup>. This effect is almost completely due to upregulation of PPAR-alpha and HIF2 and can be mimicked by PPAR-alpha agonists (e.g. Fenofibrates, see below). Moreover PHD2 deletion in tumor endothelial cells improved tumor perfusion and oxygenation and response to chemotherapy in tumor models<sup>32</sup>. The temporal activation of HIF1/2 would increase VEGF, normalize vasculature and enhance chemotherapy and RT response<sup>32,33</sup>. Known PHD

inhibitors (PHI), such as DMOG and FF4497, are well tolerated *in vivo* without any adverse effects. **Taken together the PHD/HIF/PPAR axis seems an interesting strategy to block oxygen consumption and when scheduled appropriately with RT and chemotherapy may yield to improved responses in GBM patients.**

**Fenofibrates (FF)** are FDA approved first-line lipid lowering drugs that act as agonists of PPAR-alpha; ligand activated nuclear hormone receptors that play key roles in energy homeostasis by modulating glucose and lipid metabolism. PPARs are often overexpressed in tumors and tumor endothelium<sup>34,35</sup> and PPAR ligands have reported anti-tumorigenic and anti-metastatic effects in preclinical models<sup>34,36</sup>. PPAR agonists can act both on tumor cells but also inhibit tumor angiogenesis<sup>34</sup>. Metronomic dosing of FF in several studies has also shown to improve chemotherapy response<sup>37</sup>. The anti-neoplastic effects of FF cannot solely be attributed to PPAR activation as FF have also been shown to directly induce tumor cell apoptosis as well as acutely block mitochondrial respiration resulting in a direct but transient switch to glycolysis. These properties have been shown to contribute to attenuating xenograft growth of glioblastomas and significantly reduced invasiveness<sup>38</sup>. Part of these effects are thought to be mitigated through direct inhibition of CD133 glioma stem cells<sup>39</sup>. These data strengthen the use of FF as a complementary anticancer drug, a concept supported by recent clinical trials in which chronic administration of FF along with chemotherapeutic agents used at relatively low doses minimizes the toxicity and acute side effects of chemotherapy while maintaining efficacy for patients with recurrent brain malignancies. One hypothesis is that this would improve response in conjunction with chemotherapy and RT however this has not been studied. Furthermore, in spite of these promising results, the mechanism(s) of the broad and significant anticancer effects of FF relative to other metabolic compounds remain unknown. *In vitro* data suggest that FF are several fold more potent inhibitors of mitochondrial consumption than metformin<sup>40</sup>. **In conclusion PPAR agonists such as fibrates are attractive enhancers of treatment response by reducing mitochondrial respiration.**

**Statins** are among the most potent and widely prescribed cholesterol lowering drugs and have been associated with reduced tumor incidence (e.g. esophageal, colorectal, prostate, breast and hepatocellular cancer) in humans<sup>41</sup>. One of the side effects of statins is myofibrosis, a painful atrophy of muscle cells due to induction of aerobic glycolysis because of a block in oxygen consumption<sup>42</sup> and recently shown to directly inhibit complex III<sup>43</sup>. High statin doses are transiently well tolerated and have been shown in a large prospective study to acutely reduce hypoxic hepatitis during intensive care<sup>44</sup>. Furthermore, phase II clinical trials are ongoing to assess fluvastatin on prostate cancer (NCT01992042). Thus like FF, statins cause reduced O<sub>2</sub> consumption albeit through different mechanisms. **If statins can reduce oxidative phosphorylation in GBM at tolerable doses is not known but would be an attractive hypoxic modifier well tolerated by patients and result in rapid clinical translation.**

### **Driving hypothesis**

Acute and temporal reduction of oxidative phosphorylation in GBM using FDA approved drugs will improve RT and chemotherapy scheduling and response.

### **3.2 Purpose**

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

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



### **Overall objective**

The main objective of this project is to investigate if repurposing of compounds with known and accepted toxicity profiles can lower O<sub>2</sub>-consumption in a preclinical model of glioblastoma in a way that will improve the therapeutic effect of chemotherapy (Temozolomide) and radiotherapy in tumor-bearing mice.

### **Expected outcome + deliverables:**

- To establish clinically relevant *in vivo* orthotopic glioblastoma (GBM) platform
- To obtain proof-of-concept for hypoxic modification by reducing O<sub>2</sub>-consumption on GBM response using FDA-approved drugs.
- To obtain strong preclinical evidence to apply for grants to initiate clinical studies.

The proposal is divided into two main aims with several subaims:

### **1 Establishment of Intracranial GBM Model suitable for hypoxic modification treatments**

1a Establishment of the intracranial GBM model

- ✓ These experiments will establish which models have representative characteristics of human GBM (G0-noGo)

1b Establish Dose response to Radiotherapy

- ✓ These experiments will reveal the dose of radiation needed to achieve 50 % growth delay (G0-noGo)

1c Measurement of tumor HF in these models

- ✓ These experiments establish the HF at defined tumor volumes in the selected models (G0-noGo)

1d. Demonstrate if hypoxia modifying drugs reduce tumor hypoxia in GBM

- ✓ These experiments will establish which drugs will reduce the HF in the selected GBM models (G0-noGo)

### **2. Window of opportunity trial to establish if O<sub>2</sub>-modification improves outcome in GBM**

2a. Setting the window of opportunity (phase 0) trial

- ✓ These experiments will determine whether [REDACTED]-PET can be used to monitor treatment efficacy of the two selected compounds in the three best GBM models. (Go-noGo)

2b. Hypoxic modification combined with radiation

- ✓ These experiments will determine the effect of hypoxic modifying drugs in GBM. If no enhanced radiosensitization is observed compared to control group despite a reduction in O<sub>2</sub>-consumption (IHC and [REDACTED]-PET) the experiments stops here (Go-NoGo)

2c. Hypoxic modification combined with radiation + temozolomide

- ✓ Herein we will demonstrate a window-of-opportunity for hypoxic modification in the treatment of GBM when combined with RT in a clinically relevant platform. When succesful the results should lead to the initiation of a clinical study.

### **Feasibility of our study:**

The aims described are a direct consequence of previous and ongoing work within our group.



---

### **.3 Relevance**

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

Cancer is a devastating disease affecting 1 in 3 people in their lifetime. The incidence is rising because of our aging population and has enormous societal and economic impact on our society. Treatment of cancer is often failing due to toxicity to the normal surrounding tissue, spreading of the disease (metastases) and the presence of therapy-resistant cancer cells. Glioblastoma (WHO, Astrocytoma grade IV) is the most common adult brain tumor that is highly malignant and resistant to treatment. Two year survival is only 10%. Since the last decade no major improvements in survival have been achieved. Tumor hypoxia is a common and tumor-selective feature of GBM and associated with worse outcome. Existing drugs repurposed for cancer treatment could find rapid implementation into clinical studies if found effective. *Here we will demonstrate if approved non-toxic medicines with known toxicity profiles in humans can reduce tumor hypoxia in GBM and increase treatment response.* If so we will rapidly initiate clinical studies to investigate this further in cancer patients.

---

### **3.4 Research strategy**

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

To study our main objective, i.e. to increase the therapeutic ratio for cancer by modulation of the tumor microenvironment, we have formulated two sub-objectives :

1. To establish clinically relevant *in vivo* glioblastoma models using an orthotopic immortalized and patient derived primary glioblastoma cells combined with image-guided radiotherapy to interrogate the efficacy of novel therapeutics with high translational impact.
2. To obtain proof-of-concept for hypoxic modification by reducing O<sub>2</sub>-consumption on GBM response using FDA approved lipid lowering drugs.

Some of the milestones have already been achieved which are;

- 1 selection of appropriate cell lines models based on literature search and experimental validation



- in lab.
- 2 Identification of FDA approved compounds that reduce O<sub>2</sub>-consumption in 1 PDX model and 1 GBM (U1242) cell lines in our lab.

### **Specific Aims of the proposal:**

#### **Aim 1 Establishment of New Intracranial Models**

##### *Sub aim 1a Establishment of the intracranial models*

We and others have previously demonstrated that the U87-MG intracranial GBM model has very little chronic hypoxia/necrosis and local infiltration: the main characteristics of human GBM. [REDACTED] et al., 2016). There is a need to establish new intracranial models that are highly invasive and have a high HF and are highly angiogenic when grown intracranially reflecting the main characteristics of human GBM. We and others have previously demonstrated that the U87-MG intracranial GBM model has very little chronic hypoxia/necrosis and local infiltration: the main characteristics of human GBM. [REDACTED] et al., 2016) We will therefore establish several intracranial models using both murine (e.g. GL261) human (e.g. U1242-MG) cell lines and primary patient (PDX) derived tumors. GL261 and U1242-MG are previously characterized glioblastoma models that are highly invasive and have a high HF when grown intracranially<sup>49,50</sup>. Several primary Patient derived GBM have been established in our lab as xenografts and harbor human GBM characteristics (High HF) (Unpublished [REDACTED] et al.,). Orthotopic models will be established using stereotactic surgery procedures from our lab and tumor growth will be monitored using BLI (Bioluminescence Imaging) and contrast enhanced micro-CT<sup>45,51</sup>. *These experiments will enable a selection of those models that enable orthotopic growth in vivo (Go-noGo)*

##### *Sub aim 1b Dose response to irradiation*

In PDX, GL261 and U1242 GBM models tumor growth will be monitored non-invasively using BLI or contrast enhanced micro-CT and after 2-3 tumor volume doublings, a planning CT will be made and tumors will be given a single conformal dose of 0, 2, 4, 8 or 12 Gy at a standard dose rate of 3 Gy/min. Using humane endpoints or BLI/CT, a sub-curative dose will be established that reduces time to endpoint (or time to reach 10X BLI volume) by 50 %<sup>47</sup>. *These experiments will reveal the dose of radiation needed to achieve 50 % growth delay.*

##### *Sub aim 1c. Measurement of tumor hypoxia*

For these models separate control arms will be used to assess the relationship between tumor volume and HF. Tumors will be harvested at 2 different tumor volumes as determined by BLI (U1242, GL261) or contrast-enhanced micro-CT (PDX & U1242, GL261). Before sacrifice, mice will be injected with pimonidazole, Hoechst and BrdU to measure tumor hypoxia, vessel perfusion and proliferation, respectively. The relative HF, microvessel density (MVD, CD31) and perfusion (Hoechst) will be calculated by determining the positive fraction within the total viable tumor area. We will determine the expression of endogenous hypoxia markers HIF1, HIF2 (EPAS), CAIX and PPAR-alpha. Tumor pieces will be directly frozen in liquid N<sub>2</sub> and used for IHC/RNA/protein analysis. All procedures have been developed in house, are published and are up and running<sup>45,52</sup>. *These experiments will determine the HF and enable selection of three best models GBM models.*

*Sub aims 1a-1c will define/confirm the tumor growth, HF and 50% growth delay upon RT or TMZ from 2 published models (GL261 and U1242) and identify one or more PDX models that are most suited for follow-up experiments. We will select top-3 models to continue with (Go-no-Go)*

##### *Sub aim 1d. The effect of hypoxic modification on GBM*

Next we will investigate the effect of hypoxic modification of five FDA approved drugs on intracranial glioblastomas such as prolylhydroxylase inhibitors, PPAR agonists (e.g. fenofibrate) or statins (e.g. atorvastatin). Tumors will be established and at empirically determined volumes with known HF (Aim1b) a single dose of pimonidazole (hypoxyprobe, 120 mg/kg) will be injected. Next FDA approved drugs known to affect O<sub>2</sub>-consumption at tolerable levels will be administered 2 hours later and 24 hours later mice will receive a second injection with EF5 (10 mg/kg), Hoechst (50 mg/kg) and BrdU after which the mice will be euthanized and tissues snap-frozen. EF5 is another hypoxia marker, which can be visualized with IHC as described<sup>30</sup>. A control arm will receive vehicle or Metformin and Hypoxia activated prodrug<sup>52</sup> as a negative and positive control respectively for O<sub>2</sub>-modification<sup>30</sup>. The use of two subsequent markers will enable us to determine the efficacy of hypoxic modification within the given time-frames

(0,5-4 hours). *These experiments will determine which are the best drugs and dose that have the highest reduction in O<sub>2</sub>-consumption and reduction in Hypoxic fraction (Go-noGo).*

## **Aim 2. A window of Opportunity trial for O<sub>2</sub>-modification and RT in GBM**

### *Sub Aim 2a. Setting the window of opportunity (phase 0) trial*

We will select top 2 compounds (aim 1d), which reduces O<sub>2</sub> consumption the most in the selected GBM models that has the highest HF. Our team has ample experience with [REDACTED] a 2-nitroimidazole derivative and hypoxia tracer which has improved tumor to blood ratios compared to F-MISO<sup>52,53</sup> and we have used [18F][REDACTED] in a *first in human* phase I cancer study<sup>48</sup> and currently in several phase 2 clinical trials<sup>52,54</sup>. To closely mimic clinical practice we will therefore combine [18F][REDACTED] PET imaging with micro-CT and perform a pre-treatment PET/CT scan followed by single drug administration and a post treatment rescan with [REDACTED] 24 hours later when the radionuclide from the baseline scan is washed-out, following the window-of-opportunity concept<sup>55</sup>. [REDACTED] PET images will be acquired and analyzed using a micro-PET/CT scanner (Focus 120, Siemens MicroConcorde systems)<sup>56</sup>. A volume of interest (heart/hindleg) will be defined as background and used for subtraction and a tumor to blood (TBR) or tumor to muscle (TMR) ratio of 1,4 will be considered hypoxic<sup>53</sup>. Mice that do not respond (post-treatment scan) will receive a second -higher- dose of the drug and will be imaged 24 hours using 18F[REDACTED] tracer as described above. Control groups receive vehicle only and will be imaged similarly. *These experiments will determine whether [REDACTED] PET hypoxia imaging can be used to monitor a reduction in O<sub>2</sub>-consumption of the two selected drugs in the GBM models (Go-noGo)*

### **Sub Aim 2b. Hypoxic modification combined with radiation**

Next mice randomized in groups with comparable tumor volumes as determined above receive a single pretreatment [REDACTED] the hypoxia modifier or vehicle and 24 hours later a post treatment scan followed by a single dose of irradiation (determined in aim 1b) using Smart Platform and followed until endpoint (as defined above). Depending on the outcome the treatment will be differently adapted (increase drug dose, adjustment treatment plan and scanning time). Groups will be designated as *responders* and *non-responders* (see Figure1). A control group will receive vehicle, undergo a dynamic PET scan and will be treated with a single dose of radiation and followed using non-invasive imaging to determine until surrogate-endpoint using non-invasive imaging as determined before [REDACTED]. This group will be designated *non-responders* and would be comparable in real patient trials in which the drug would not be given (because of absence of hypoxia) or the treatment adapted (because of lack of response to the hypoxic modifier). *These experiments will determine the radiosensitization effect of hypoxic modifying drugs in GBM. If no enhanced radiosensitization is observed compared to control group despite a reduction in O<sub>2</sub>-consumption (IHC and [REDACTED] PET) the experiments stops (Go-NoGo)*

### **Sub Aim 2c. Hypoxic modification combined with radiation + temozolomide**

The above-described aims will address if a reduction in O<sub>2</sub> consumption will increase *in vivo* radio-sensitivity in intracranial models for glioblastoma. Standard of care treatment for GBM consists of radiotherapy (RT) with temozolomide (TMZ). In this last aim we will therefore investigate if hypoxic modification will also enhance standard of care treatment. We will focus on 1 model and investigate the drug which most strongly reduces O<sub>2</sub>-consumption in conjunction with single dose radiotherapy. We have ample experience with TMZ and RT in conjunction with novel drugs and will follow our standard protocol: single dose RT + concomitant TMZ (30 mg/ml 2 weeks, 3 days on - 4 days off). These conditions give a significant tumor response [REDACTED]. Tumor growth will be followed by BLI/CT until surrogate endpoint (Figure 1). *Herein we will demonstrate a window-of-opportunity for hypoxic modification in the treatment of GBM in a clinically highly relevant platform.*



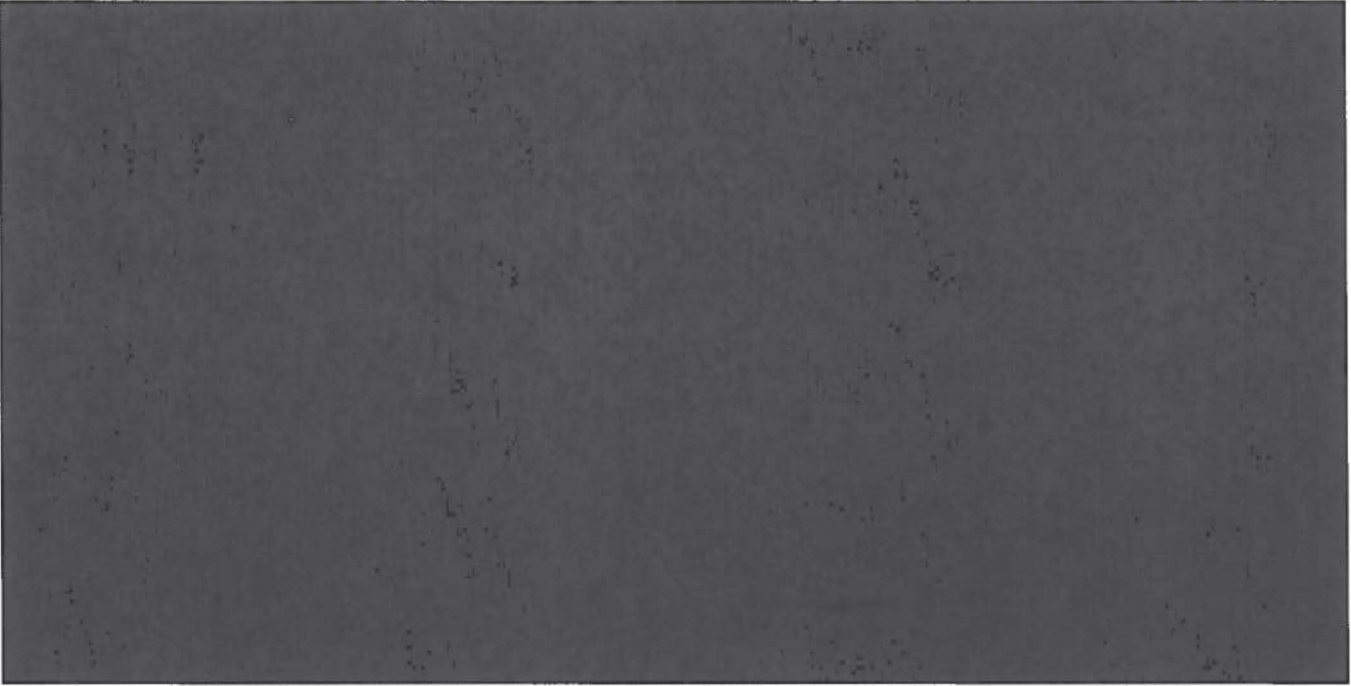


Figure 1: Establishment of a novel representative GBM model (aim1) and Window-of-opportunity trial in GBM platform (aim 2) using hypoxia trace [REDACTED] PET as biomarker to monitor treatment response to O2-modification prior to standard of care protocol (RT+TMZ) using image guided radiotherapy platform to measure outcome (surrogate endpoint). (BLI = Bioluminescence Imaging, uCT =micro-CT, [REDACTED] = hypoxia marker, uIGRT=Image-guided radiotherapy)

Eventually, we aim to translate our findings into clinical applications [REDACTED]

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

**1 Establishment of New Intracranial GBM Model to test hypoxic modification treatments**

Sub aim aim 1a Establishment of a realistic intracranial GBM model

Sub aim aim 1b Establish Dose response to Radiotherapy and TMZ

Sub aim aim 1c Measurement of tumor HF in selected models

Sub aim aim 1d Demonstrate if hypoxia modifying drugs reduce tumor hypoxia in GBM

**2. Window of opportunity trial to establish that O2-modification improves outcome in GBM**

Sub aim 2a. Setting the window of opportunity (phase 0) trial

Sub aim 2b. Hypoxic modification combined with radiation only

Sub aim 2c. Hypoxic modification combined with radiation + temozolomide

**Animal procedures**

- Intracranial surgery and implantation of tumor cells or fragments (aim 1,2)
- Non-invasive imaging via bioluminescence imaging and/ or contrast enhanced micro-CT (aim 1,2)
- Conformal Irradiation using small animal irradiator (aim 1,2)
- IP/IV Injection with pimonidazole, EF5, BrdU, Hoechst, tissue analysis by IHC (aim1,2)
- [REDACTED]
- IV/IP administration O2-modifiers (aim 1,2)
- IP administration temozolomide (aim 2)

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

This is a very specific proposal aimed at addressing one question based on the fact that hypoxia limits Radiotherapy and Chemotherapy response:

*Does reduction in O2-consumption in GBM in vivo improve the response to combination treatment with Radiotherapy and Chemotherapy (TMZ)?*

The proposal follows a logical order from establishing a representative model that has a defined HF to identifying drugs that can reduce that HF and following our hypothesis and previous work that that RT

and or TMZ chemotherapy can improve the outcome of treatment as a consequence of reduced tumor hypoxia. The interdependency is directly related to the no-Go decisions

The necessary milestones can be deducted from the Go/no-GO chart (Figure 2 below) and include:

1. Establishment of a reproducible intracranial GBM model harboring characteristics of human GBM such as micro-infiltration, angiogenesis, HF and necrosis.
2. Defining RT and TMZ dose-response (50% reduction in Growth delay) in these GBM models
3. Establishing a quantitative reduction in O<sub>2</sub>-consumption on the HF of intracranial GBM using non-invasive imaging and IHC tissue analysis
4. Defining a therapeutic window for intervention at increased O<sub>2</sub>-availability using PET-imaging
5. Obtaining an enhanced therapeutic response using drugs combined with standard of care treatment (RT+TMZ)



**Figure 2:** GO/no-GO flow chart with decision tree of appendices 1 (see text for details)

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Therapeutic targeting of O <sub>2</sub> -consumption in intracranial GBM models
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	



## References:

- 1 Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 987-996, doi:10.1056/NEJMoa043330 (2005).
  - 2 Brown, J. M. & Giaccia, A. J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer research* **58**, 1408-1416 (1998).
  - 3 Vaupel, P. & Mayer, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer metastasis reviews* **26**, 225-239, doi:10.1007/s10555-007-9055-1 (2007).
  - 4 Spence, A. M. *et al.* Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clin Cancer Res* **14**, 2623-2630, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4995 (2008).
  - 5 Evans, S. M. *et al.* Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* **10**, 8177-8184, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1081 (2004).
  - 6 Turner, N. C. & Reis-Filho, J. S. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol* **13**, e178-185 (2012).
  - 7 Singh, S. K. *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401, doi:nature03128 [pii] 10.1038/nature03128 (2004).
  - 8 Merlos-Suárez, A. *et al.* The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse. *Cell Stem Cell* **8**, 511-524 (2011).
  - 9 Baumann, M., Krause, M. & Hill, R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nature reviews. Cancer* **8**, 545-554, doi:10.1038/nrc2419 (2008).
  - 10 Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756-760, doi:nature05236 [pii] 10.1038/nature05236 (2006).
  - 11 Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* **63**, 5821-5828 (2003).
  - 12 Yuan, X. *et al.* Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* **23**, 9392-9400, doi:10.1038/sj.onc.1208311 (2004).
  - 13 Beier, D. *et al.* CD133+ and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles. *Cancer research* **67**, 4010-4015, doi:10.1158/0008-5472.can-06-4180 (2007).
  - 14 Li, Z. *et al.* Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer cell* **15**, 501-513, doi:10.1016/j.ccr.2009.03.018 (2009).
  - 15 Zhou, Y. *et al.* Metabolic alterations in highly tumorigenic glioblastoma cells: preference for hypoxia and high dependency on glycolysis. *J Biol Chem* **286**, 32843-32853, doi:10.1074/jbc.M111.260935 (2011).
  - 16 Seidel, S. *et al.* A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 *Brain* **133**, 983-995 (2010).
  - 17 Bar, E. E., Lin, A., Mahalraki, V., Matsui, W. & Eberhart, C. G. Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol* **177**, 1491-1502, doi:10.2353/ajpath.2010.091021 (2010).
  - 18 Soeda, A. *et al.* Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 $\alpha$ . *Oncogene* **28**, 3949-3959, doi:10.1038/onc.2009.252 [pii] 10.1038/onc.2009.252 (2009).
- 
- 22 Jung-whan, K., Irina, T., Gregg, L. S. & Chi, V. D. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism* **3**, 177-185, doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002 (2005).
  - 23 Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. & Denko, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* **3**, 187-197, doi:10.1016/j.cmet.2006.01.012 (2006).
  - 24 Wilson, W. R. & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **11**, 393-410, doi:nrc3064 [pii] 10.1038/nrc3064 (2011).
  - 25 Sorensen, M. D. *et al.* Chemoresistance and chemotherapy targeting stem-like cells in malignant glioma. *Adv Exp Med Biol* **853**, 111-138, doi:10.1007/978-3-319-16537-0\_7 (2015).
  - 26 Toustrup, K. *et al.* Gene expression classifier predicts for hypoxic modification of radiotherapy with nimorazole in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Radiother Oncol* **102**, 122-129, doi:10.1016/j.radonc.2011.09.010 (2012).
  - 27 Overgaard, J. Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol* **25**, 4066-4074, doi:10.1200/JCO.2007.12.7878 (2007).
  - 28 Secomb, T. W., Hsu, R., Ong, E. T., Gross, J. F. & Dewhirst, M. W. Analysis of the effects of oxygen supply and demand on hypoxic fraction in tumors. *Acta Oncol* **34**, 313-316 (1995).
  - 29 Bol, V. *et al.* Reprogramming of tumor metabolism by targeting mitochondria improves tumor response to irradiation. *Acta Oncol* **54**, 266-274, doi:10.3109/0284186X.2014.932006 (2015).
  - 30 Zannella, V. E. *et al.* Reprogramming metabolism with metformin improves tumor oxygenation and radiotherapy response. *Clin Cancer Res* **19**, 6741-6750, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1787 (2013).
  - 31 Aragones, J. *et al.* Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* **40**, 170-180, doi:10.1038/ng.2007.62 (2008).

- 32 Mazzone, M. *et al.* Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* **136**, 839-851, doi:10.1016/j.cell.2009.01.020 (2009).
- 33 Leite de Oliveira, R. *et al.* Gene-targeting of Phd2 improves tumor response to chemotherapy and prevents side-toxicity. *Cancer cell* **22**, 263-277, doi:10.1016/j.ccr.2012.06.028 (2012).
- 34 Panigrahy, D. *et al.* PPARalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 985-990, doi:10.1073/pnas.0711281105 (2008).
- 35 Holland, C. M. *et al.* Transcriptome analysis of endometrial cancer identifies peroxisome proliferator-activated receptors as potential therapeutic targets. *Mol Cancer Ther* **3**, 993-1001 (2004).
- 36 Niho, N. *et al.* Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer research* **63**, 6090-6095 (2003).
- 37 Robison, N. J. *et al.* A phase II trial of a multi-agent oral antiangiogenic (metronomic) regimen in children with recurrent or progressive cancer. *Pediatr Blood Cancer* **61**, 636-642, doi:10.1002/pbc.24794 (2014).
- 38 Wilk, A. *et al.* Molecular mechanisms of fenofibrate-induced metabolic catastrophe and glioblastoma cell death. *Mol Cell Biol* **35**, 182-198, doi:10.1128/MCB.00562-14 (2015).
- 39 Binello, E., Mormone, E., Emdad, L., Kothari, H. & Germano, I. M. Characterization of fenofibrate-mediated anti-proliferative pro-apoptotic effects on high-grade gliomas and anti-invasive effects on glioma stem cells. *J Neurooncol* **117**, 225-234, doi:10.1007/s11060-014-1385-6 (2014).
- 40 Brunmair, B. *et al.* Fenofibrate impairs rat mitochondrial function by inhibition of respiratory complex I. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 109-114, doi:10.1124/jpet.104.068312 (2004).
- 41 Kubatka, P., Kruzliak, P., Rotrekl, V., Jelinkova, S. & Mladosievicova, B. Statins in oncological research: from experimental studies to clinical practice. *Crit Rev Oncol Hematol* **92**, 296-311, doi:10.1016/j.critrevonc.2014.08.002 (2014).
- 42 Vaughan, R. A., Garcia-Smith, R., Bisoffi, M., Conn, C. A. & Trujillo, K. A. Ubiquinol rescues simvastatin-suppression of mitochondrial content, function and metabolism: implications for statin-induced rhabdomyolysis. *Eur J Pharmacol* **711**, 1-9, doi:10.1016/j.ejphar.2013.04.009 (2013).
- 43 Schirris, T. J. *et al.* Statin-Induced Myopathy Is Associated with Mitochondrial Complex III Inhibition. *Cell Metab* **22**, 399-407, doi:10.1016/j.cmet.2015.08.002 (2015).
- 44 Drolz, A. *et al.* Statin therapy is associated with reduced incidence of hypoxic hepatitis in critically ill patients. *J Hepatol* **60**, 1187-1193, doi:10.1016/j.jhep.2014.01.019 (2014).

49 Clarke, R. H. *et al.* Sustained radiosensitization of hypoxic glioma cells after oxygen pretreatment in an animal model of glioblastoma and in vitro models of tumor hypoxia. *PLoS One* **9**, e111199, doi:10.1371/journal.pone.0111199 (2014).

50 Zhao, Y. *et al.* An extensive invasive intracranial human glioblastoma xenograft model: role of high level matrix metalloproteinase 9. *Am J Pathol* **176**, 3032-3049, doi:10.2353/ajpath.2010.090571 (2010).





## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project      Verbeteren van de behandeling van hersenkanker door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen.
- 1.2 Looptijd van het project      5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5)      Glioblastoom, zuurstof gebrek, niet-invasieve beeldvorming, radiotherapie, bestaande geneesmiddelen

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Glioblastoma Multiforme (GBM) is de meest voorkomende hersentumor bij volwassenen met ongeveer 600 patiënten per jaar in Nederland. De gemiddelde overleving na diagnose is slechts 15 maanden. Nieuwe GBM patiënten worden behandeld met een combinatie van chirurgie, radiotherapie en chemotherapie. Helaas werkt bij veel patiënten de radiotherapie en chemotherapie niet of maar tijdelijk. Nieuwe therapieën die tumorgroei vertragen en therapie-resistentie voorkomen zijn noodzakelijk om de levensverwachting van GBM patiënten te vergroten.
- Voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën is het belangrijk beter inzicht te

krijgen in de ontstaanswijze van GBM en de mechanismen van therapie-resistentie. Tumor hypoxie (zuurstofgebrek) dat ontstaat door defecte bloedvaten in de tumor is een belangrijk kenmerk van GBM en veroorzaakt de therapie-resistentie. In eerder onderzoek is aangetoond dat geregistreerde geneesmiddelen waaronder bloed-vet-verlagende medicijnen (o.m. Statinen) positieve effecten kunnen hebben op tumor hypoxie door verlaging van zuurstofverbruik in kanker cellen. Hiermee zou het effect van de huidige therapieën versterkt kunnen worden met als gevolg een beter resultaat van de behandeling en langere overlevingskansen voor de patiënt. Het onderzoek wordt gefinancierd door KWF Kankerbestrijding.

De doelstelling van deze aanvraag is driedelig:

- 1- Ontwikkelen van een muismodel voor GBM met alle karakteristieken van GBM bij patiënten, waaronder tumor hypoxie.
- 2- Identificeren van bestaande geneesmiddelen die deze tumor hypoxie verminderen.
- 3- Aantonen dat vermindering in tumor hypoxie leidt tot een betere therapie response

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

- 1- nieuwe toepassingen van reeds geregistreerde medicijnen die mogelijk de overleving van GBM verbeteren
- 2- versnelde start van patiënten studies
- 3-tumor Hypoxie is een algemeen kenmerk van kanker waardoor de bevindingen mogelijke breder toepasbaar zijn.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

We maken in dit onderzoek gebruik van volwassen muizen en verwachten dat er maximaal 1490 muizen nodig zijn in 5 jaar.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

- 1-chirurgische ingrepen in het brein
- 2- tumor groei
- 3-bij-effecten van radiotherapie en chemotherapie zoals diarree gewichtsverlies, huidirritatie.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

- 45 % maximaal matig ongerief  
55 % maximaal ernstig ongerief

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Levensbeëindiging

## 4 Drie V's

4.1 **Vervanging**  
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig

De communicatie tussen normale cellen (bloedvaten, bindweefsel etc.) en kankercellen in een tumor is bepalend voor de groei en het effect van anti-kankertherapieën. Deze complexe cel-interacties met (defecte) bloedvaten

is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

zijn op dit moment nog niet na te bootsen in het laboratorium waardoor het noodzakelijk is hiervoor een proefdiermodel te gebruiken.

**4.2 Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

De wetenschappelijk onderbouwing van gesubsidieerd onderzoek staat garant voor goede studies met een minimum aan proefdieren en ongerief. Vermindering wordt ten dele bereikt door celkweek technieken. Beeldvormingstechnieken worden gebruikt om direct het effect van medicijnen op de tumor groei te meten en indien nodig aan te passen in een en hetzelfde levende dier, waar voorheen meerdere dieren nodig waren.

**4.3 Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Bij dit onderzoek maken we gebruik van muizen omdat de kennis over kankerontwikkeling en therapie hier het best bekend zijn. Moleculaire beeldvorming om kanker groei en therapie respons zichtbaar te maken geeft een verfijning omdat je zonder instrumenten het lichaam in gaat om deze processen nauwkeurig te meten en indien nodig (net zoals bij patiënten) de therapie aan te passen.

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

We zullen dagelijks de dieren controleren op hun welzijn. Ze krijgen adequate verdoving en pijnstilling en indien een humaan eindpunt wordt bereikt wordt het dier uit het experiment genomen.

**5 In te vullen door de CCD**

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Maastricht University
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 1             | Intracranial GBM model for improving standard of care treatment using Hypoxic modification |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

One experimental disease model will be used :

Model: Intracranial (orthotopic) Glioblastoma in mouse (*mus musculus*).

Type: Human primary and human and murine established GBM cells will be used.

The used animal procedures within this study are aimed at:

- 1- Assessing glioblastoma growth in mice after intracranial surgery
  - High tumor take and phenotypic characteristics of human GBM; hypoxia and necrosis being the most important outcome parameters
- 2- Quantitative in vivo analysis of tumor hypoxia and hypoxic modification using non-invasive imaging
  - Bio-Luminescence Imaging (BLI) for growth monitoring
  - Contrast enhanced micro-CT for radiotherapy treatment planning
  - [REDACTED] or assessment tumor hypoxia and effect of hypoxic modification
- Quantitative in vitro tissue analysis of tumor hypoxia and hypoxic modification using IHC
  - Reduction in hypoxic fraction by drugs is the parameter
- 4- Assessing therapeutic efficacy from targeted conformal irradiation using an animal irradiator (Smart) + concurrent temozolomide treatment + hypoxic modification
  - Outcome is therapeutic response as tumor growth delay as measured by non-invasive imaging (micro-CT and BLI)

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



For all intracranial GBM models: wildtype immune-compromised (human models) or immune-competent (murine models) mice will be purchased and the following procedures will be conducted:

1. Administration of small molecules, drugs, and control vehicles
2. Surgery and orthotopic injection of cells/tissue-fragments in brain under adequate anesthesia and analgesia and euthanasia
3. Blood sampling following NCR3 procedure (<https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling>)
4. External beam irradiation using small animal irradiator (Smart)
5. Non-invasive imaging (BLI, micro-CT, micro-PET)

All animals (100%) will be undergo at minimum surgical intervention, non-invasive imaging and euthanasia (2).

The above-mentioned models will be used in evaluation of the defined research questions. Animals may be assigned to control, treatment, imaging, or other groups as listed below.

Overview of animal procedures, nature and frequency of each procedure are presented in appendix 1 Table 1.

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

Prior to performing an experiment we perform statistical analysis (power analysis) to ensure that we use the minimum number of mice per group. We use the statistical formula:  $n = 2(z_{\alpha/2} - z_{\beta})^2 * (s/d)^2$  in which  $s$  = variance,  $d$  = difference and  $2(z_{\alpha/2} - z_{\beta})^2 = F$ , using a power of 80% with  $\alpha = 0.05$  (two-sided tested),  $F_{0.80} = 15.7$ . The number of animals can therefore be calculated by  $n = 15.7 * (s/d)^2$ . We correct this number also for drop-out (e.g. 10% for no tumor formation or prematurely reaching human endpoints) and rounded up the final number only at the end. Values  $s$  and  $d$  will be based on literature and own published experience with intracranial models for GBM.

#### **B. The animals**

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

Mus musculus: Immune-competent or -compromised adult animals obtained from a commercial licensed breeder.

The total number of animals for each experimental arm, following the statistical methods described above, will be maximal 10 animals, taking into account a 10% drop-out.

A maximum of **1490** animals is requested within this appendix (justification attached in appendix 1\_Table2.pdf and Go-No-Go chart).

#### **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research

strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

#### **Replacement**

Although animal studies within cancer research are inevitable, due to the need of a complex homeostasis between a tumor, the tumor microenvironment and the surrounding normal healthy tissues, we will always consider the principles of replacement, reduction and refinement. Whenever possible, results will be obtained in 2D or 3D culture models such as spheroids and organoids. Extensive in vitro testing using, but not restricted to, cell lines, tissues, patient material, previously isolated animal materials (sections, proteins, RNA, ...) has been done to exclude treatment combinations predicted to be less effective/informative in vivo and thereby avoiding unnecessary animal experiments.

#### **Reduction**

By conducting non-invasive imaging modalities, the number of animals is largely reduced because each animal can be non-invasively imaged and their biological response quantitatively derived as a function of time. Additionally, repeated in vivo imaging as proposed in this application maybe used to establish a therapeutic window by using a single animal which at the optimal time point may be treated -only- when the drug is effective. Before embarking animal experiments, extensive literature studies and discussions with collaborators will enable us to select to optimal procedures and models. Imaging information obtained from different non-invasive imaging techniques (CT, PET, MRI and BLI) will be used to monitor treatment response. Especially for this purpose, in-house made clickable positioning beds have been developed to shorten overall animal anesthesia time. Anesthesia time is also reduced by using beyond state-of-the-art ultra-sensitive imaging equipment with short acquisition times, the use of optimal contrast agents (i.e. omnipaque) and highly efficient radionuclide labeling and detection (18F-HX4 micro-PET).

#### **Refinement**

Life with end-stage brain tumor is considered severe. The intracranial model is chosen because extensive literature point to important role so neurotrophic factors on glioma development and the blood-brain barrier which is an obstacle for efficient drug delivery and uptake. The intracranial model combined with multimodality imaging using human or murine GBM models is the model most closely related to human GBM and therefore expected to be the most relevant. We have extensive published [redacted] et al (2014, 2015, 2016) experience in using in vivo imaging to monitor tumor growth and will use BLI/CT imaging as surrogate endpoints prior to the occurrence of humane endpoints whenever possible. We previously established that tumor-BLI measurements at 10 times total photon increase compared to starting volume (=2 x doubling of the BLI signal) and/or a calculated CT tumor volume (125-150 mm<sup>3</sup>) tumors have undergone 2-3 volume doublings in situ. Although 100% of mice will be developing an orthopic brain tumor many mice will be euthanised using this surrogate endpoint for tissue analysis or to measure direct effect of oxgen modifiers (1-24 hr post drug) and will therefore not reach the classification of severe discomfort (endstage tumor).

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. These include use of appropriate analgesia and anesthesia procedures whenever necessary. There are no adverse environmental effects.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

n/a

### **Accommodation and care**

#### **F. Accommodation and care**

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

of the Directive 2010/63/EU?

No

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

#### **G. Location where the animals procedures are performed**

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

### **Classification of discomfort/humane endpoints**

#### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used following to the GV-SOLAS guidelines ([http://www.gvsolas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/Anaest.\\_Analgesie/Schmerztherapie\\_Mai\\_2015\\_e.pdf](http://www.gvsolas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Anaest._Analgesie/Schmerztherapie_Mai_2015_e.pdf)). These include use of appropriate analgesia and anesthesia procedures whenever necessary (Schäfer et al 2014, 2015, 2016). Follow-up of the animals will be done regularly, at least daily, to ensure rapid notifications of signs of discomfort. Obviously, after experimental procedures e.g. surgery, the animals will be followed up more frequently. Human endpoints, as described below, will be strictly followed.

#### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

Immune-compromised animals are susceptible to infection. End-stage intracranial tumors can cause increased interstitial pressure (brain), weight loss, loss of appetite, loss of coordination, abnormal gait, seizures, unresponsiveness and abnormal breathing. Radiotherapy can cause necrosis, inflammation, fibrosis in irradiated organs and skin toxicity (redness, inflammation and ulcerations) depending on the administered dose and lead to loss of fur pigmentation. Surgical procedures can cause infections, although with very low incidence, at the site of the wound. Chemotherapeutic drugs such as TMZ used in this study can cause unexpected adverse effects, depending on the administered dose (dose limiting toxicity), such as diarrhea and sickness although we have not observed this at these doses in combination with RT in our previous studies. Toxic side effects as a result of O2-modifying drugs are not expected because they already approved drugs taken for decades by millions of people without toxicity profiles in human and tested in mouse. Moreover they are only administrated during the short time course. All animals will be closely monitored for adverse effects and surrogate and humane endpoints will be applied when distress is unacceptable (see point J).

Explain why these effects may emerge.

Due to the fast tumor growth, normal tissue can lose its proper function. Radiotherapy can cause normal tissue toxicity due to production of reactive oxygen/nitrogen species (ROS) which may result in immediate cell death, inflammation, tissue fibrosis and unrepaired DNA damage which alters cellular



function. Surgery requires the skin to be cut and sutured. All these effects may result in increased discomfort. Dose-limiting toxicities of drugs and chemotherapeutics can unexpectedly occur in tumor-bearing animals while not observed in non-tumor bearing animals during testing phase, attributed to the bystander effect in cancer cells, i.e. drug when activated leaks out into neighbouring cells.

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

We will monitor the animals on a daily basis by experienced animal biotechnicians; if any unexpected adverse effect will show up we will take measures accordingly (e.g. adequate pain medication or antibiotics to prevent or combat infection). When using immune compromised mice preventive measures such as adequate housing and adjusted working procedures will be used. Surgery will be done aseptically and antibiotics will be applied whenever necessary. High energy diets and gel-pads for maintaining ions/fluids will be given when needed after surgery and administration of anti-cancer drugs and chemotherapeutic agents.

#### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

If animals are unacceptably distressed (to be determined by the researcher and/or animal caretakers), humane endpoints will be applied.

The following situations will be considered as humane endpoints (<https://www.humane-endpoints.info/en/literature-references>):

1. Emaciation (> 15 % weight loss in 1-2 days or >20 % of weight loss (compared to weight at the start of the experiment) overall during the study)
2. Respiratory abnormalities
3. Dehydration accompanied by visible loss of muscle mass (cachexia)
4. Loss of coordination, abnormal gait, seizures
5. The tumor volume is more than 10 x starting volume using non-invasive imaging (BLI, CT). We previously established that tumor-BLI measurements at 10 times total photon increase compared to starting volume (=2 x doubling of the BLI signal) and/or a calculated CT tumor volume (125-150 mm<sup>3</sup>) tumors have undergone 2-3 volume doublings in situ.
6. Humane endpoints will be further based on altered general clinical symptoms: e.g. behavior, response to stimuli, lack of grooming / aggressiveness, skin, hair, feces... and other obvious symptoms indicative for more than moderate discomfort due to tumor burden or treatment.
7. If within 8 weeks after tumor implantation no reproducible tumor growth within a period of 4 consecutive weeks can be observed the animal will be euthanised and histological analysis will be performed to determine the presence of tumor cells.

Indicate the likely incidence.

The incidence of most parameters is less than 10%. The animals will be well monitored by experienced people and will aim to avoid reaching these humane endpoints. Surrogate endpoints and frequent follow up of the animals will allow timely interventions to minimize these.

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

Five procedure groups have been identified:

1. Administration of small molecule compounds, drugs, and control substances anesthesia and pain medication
  - a. Intraperitoneally (mild)
  - b. Intravenously (mild)
  - c. Inhalation anesthesia (mild)
  - d. Subcutaneous (mild)
2. Surgery and orthotopic injection of cells/tissue-fragments in brain under adequate anesthesia and analgesia (moderate) Euthanasia (mild max 1 times non-recovery)
3. Growth of intracranial brain tumor (moderate)

4. Tissue blood sampling. (max 3 times)(mild)
5. Irradiation (single dose schedule) (mild)
6. Non-invasive imaging under anesthesia (mild-moderate)

The method of administration will be determined based on the most appropriate method of administration. If multiple administration routes are possible, the administration route with lowest discomfort will be used. We note that 100% of the animals will be exposed to procedure 2 and one or more of the modalities listed above.

Table 2 summarizes the estimated numbers of animals with procedures and cumulative discomfort level. While individual procedures may be mild, the accumulated discomfort is presented as animals may have repeated mild discomfort procedures (becomes moderate) or a single moderate discomfort procedure.

**Experimental procedures:**

Animals may be assigned to control, treatment, imaging, or other groups as listed in Table 2.

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

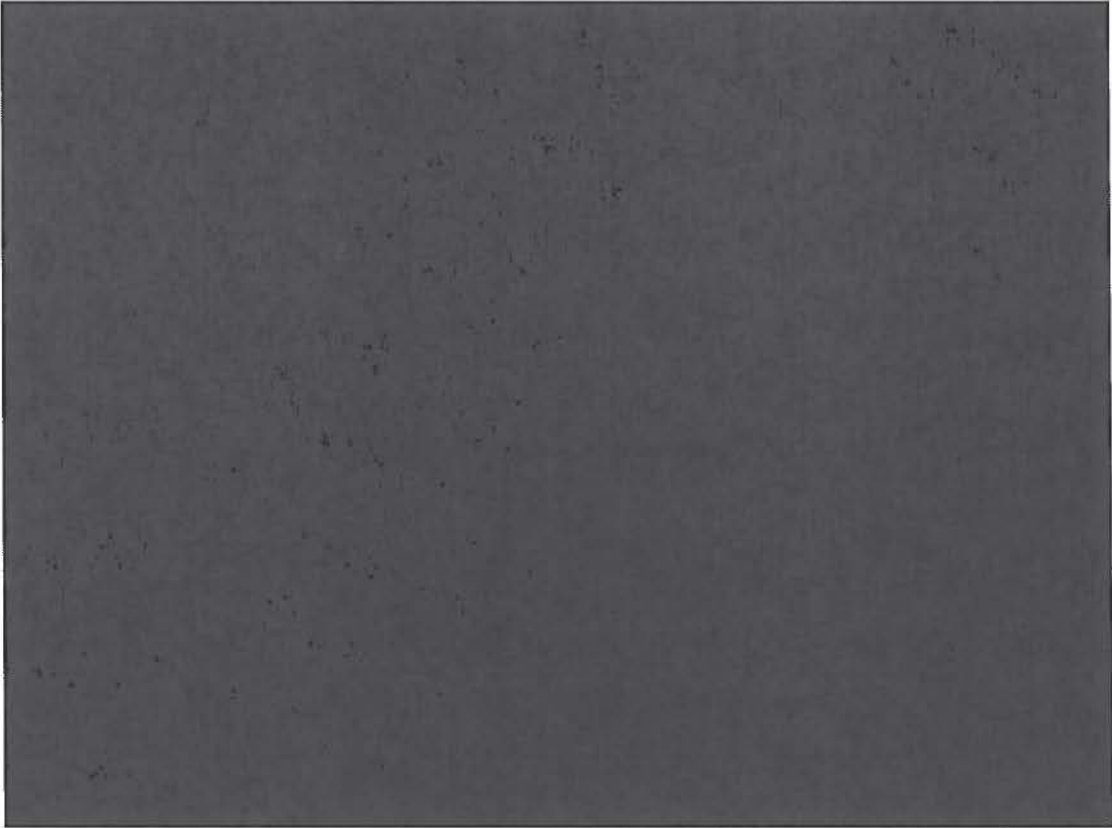
At the end of the experiments blood, tumors and other tissues will have to be collected for extensive analysis.

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

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

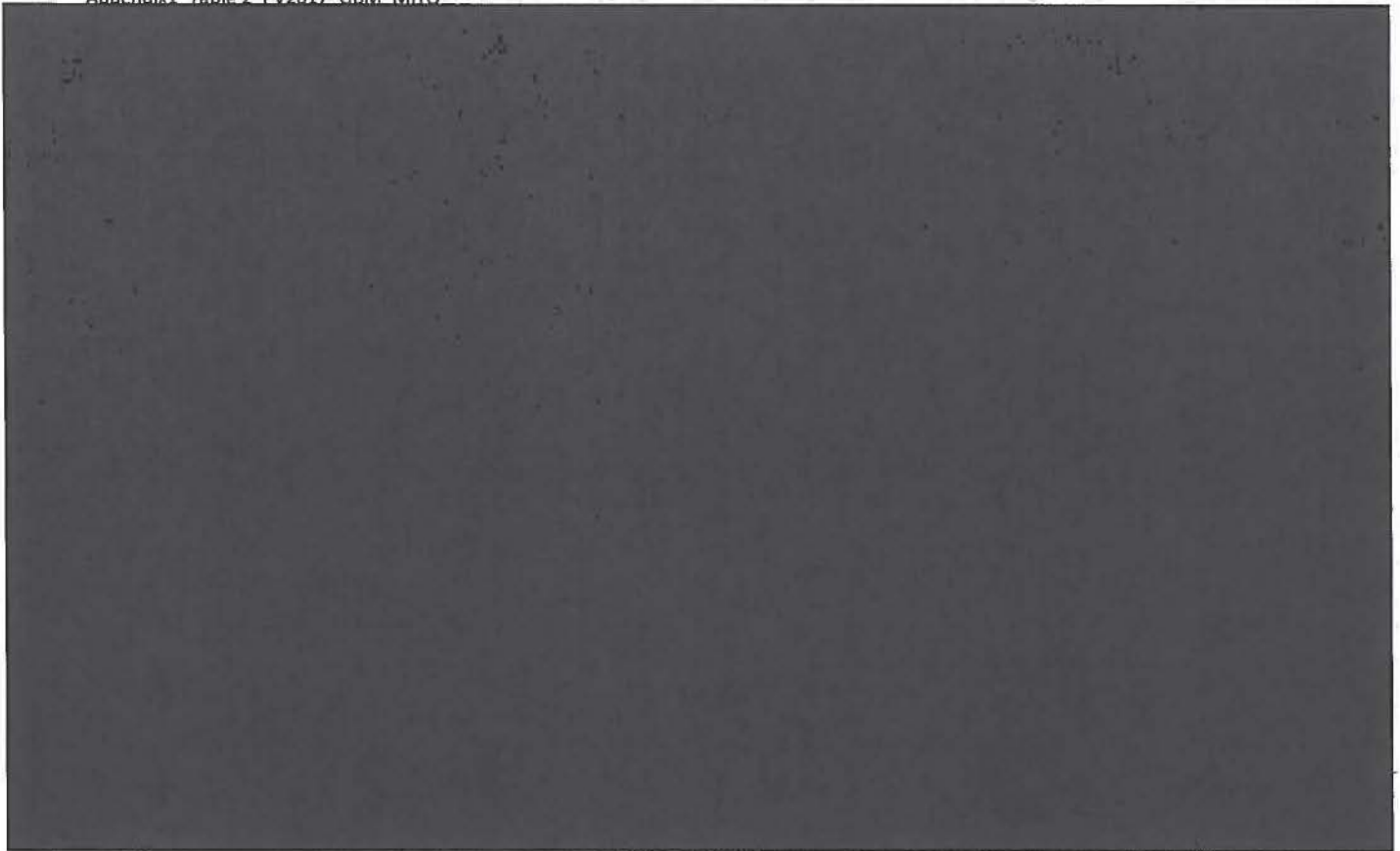
Yes

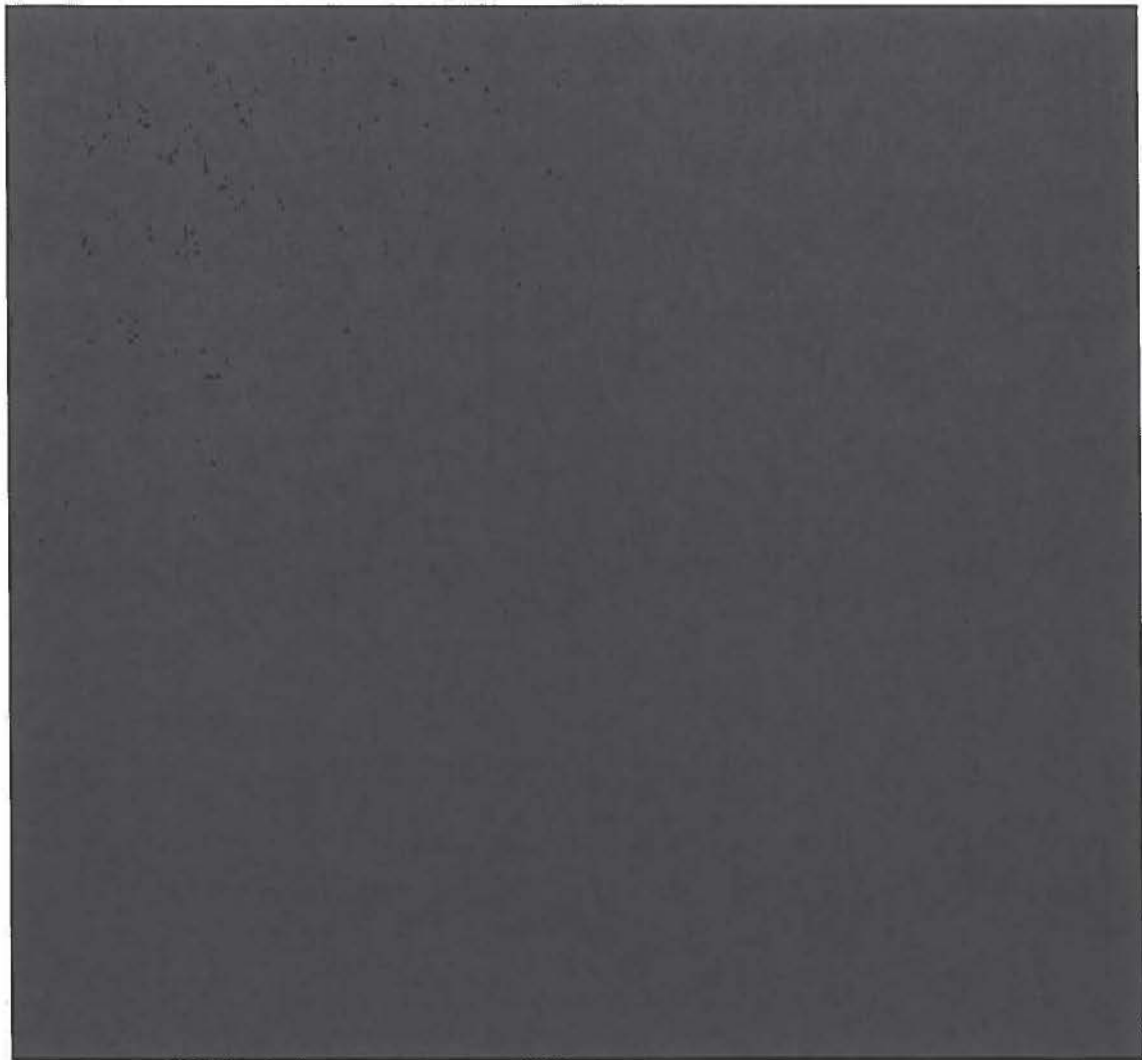
Appendix 1\_table 1. PV\_2017\_GBM\_MITO





Appendix 1 Table 2 PV2017 GBM MITO





## DEC-advies PV 2017-003

### Preambule:

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Targeting Oxygen Metabolism to improve Glioblastoma outcome.*
3. **Titel van de NTS:** *Verbeteren van de behandeling van hersenkanker door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen.*
4. **Type aanvraag:**
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:**
  - naam DEC: *DEC-UM*
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon [REDACTED]
6. **Adviestraject** (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC; 16-02-2017
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken; 24-02-2017
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van / tot
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag
  - advies aan CCD
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

*De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD. Zie ook de verklaring van de vertegenwoordiger van de vergunninghouder onder punt 6 ondertekening van de aanvraag.*
8. **Eventueel horen van aanvrager: N.V.T.**
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
  - Datum; 02-03-2017
  - Gestelde vragen, zie onderstaand:



### **3 Algemene projectbeschrijving**

#### **3.1 Achtergrond**

##### **Algemene opmerkingen:**

1. Er wordt gesteld dat “*PPAR agonists such as fibrates are attractive enhancers of treatment response by reducing mitochondrial respiration*”, maar bevorderen zij juist niet de mitochondriële oxidatie daar zij rechtstreeks de vetzuuroxidatie bevorderen?

##### **Reactie:**

*De rol van PPAR in vetzuur oxidatie is bekend bij de aanvrager en wordt ook in de PV genoemd. Dit PV onderzoekt een andere rol van PPAR agonisten met enkele referenties die deze functie ondersteunen in vitro en in vivo waaronder GBM. (Wilk 2005, Brunmair 2004). Onze eigen resultaten in GBM cel lijnen (U1242 en een PDX model ) bevestigen dat oa. fenofibraat mitochondriële zuurstof consumptie remt.*

2. Werken alle drie beoogde groepen van farmaca naar verwachting in op de GBM?

##### **Reactie:**

*Van alle farmaca is bekend dat ze de bloed hersenbarrière kunnen passeren. In vitro blijken de fenofibraten, prolyl hydroxylases en de statines de zuurstof consumptie van GBM cel lijnen te remmen in gepubliceerd werk en onze eigen ongepubliceerde onderzoek. Of deze farmaca ook werken in een GBM model is alleen van fenofibraat vastgesteld en is de basis van dit onderzoek.*

3. Er wordt gesteld dat het terugdringen van tumor hypoxie, dan wel het stimuleren van tumor reoxygenation, (via HIF) kan leiden tot verdere hypoxie (“de beschreven “catch 22”). Wat niet geheel duidelijk is, is in hoeverre de huidige voorgestelde behandelmethoden een dergelijk ongewenst neveneffect kunnen geven of juist zouden omzeilen.

##### **Reactie:**

*Dat zal moeten blijken uit de experimenten. De idee is dat door een tijdelijke opheffing van de hypoxie er meer zuurstof beschikbaar is in tumor cellen waardoor deze (tijdelijk) gevoeliger zouden moeten zijn voor radiotherapie. In deze experimenten vindt de toediening van farmaca alleen plaats kort voor en gedurende de radiotherapie.*

#### **3.4 Onderzoeksstrategie**

##### **3.4.1**

##### **Algemene opmerking:**

1. In hoeverre leiden de toegediende farmaca tot systemische effecten en welke invloed zou zulks eventueel hebben op het ongerief der dieren?

##### **Reactie:**

*In dit onderzoek worden bestaande geneesmiddelen met aanvaardbare toxiciteits profielen en bekende risico 's gebruikt, die door miljoenen mensen dagelijks worden genomen voor jaren achtereen.*

##### **Vraag:**

1. Onder Sub Aim 2a wordt gesteld dat “we will select top 2 compounds”. Heeft U op basis van eerder *in vitro* onderzoek ook reeds een top twee kunnen identificeren en zo ja, waarom gebruikt U die dan niet als basis?

##### **Reactie:**

*Het is niet te voorspellen of de top kandidaten in vitro ook de beste kandidaat drugs in vivo zijn. De farmacodynamica en farmacokinetiek zijn verschillend voor elke drug. Dat kan dus niet vooraf worden bepaald. Drugs die geen effect hebben in vitro worden in iedere geval niet meegenomen in vivo.*

### 3.4.4

#### Appendix 1

##### Vragen:

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. Op welke uitleesparameter(s) is uw power analyse gebaseerd?

##### Reactie:

- orthotope tumorgroei in brein
- effect van bestraling en/of chemotherapie op de tumor groei in brein
- effect van zuurstof consumptie remmende drugs op hypoxische fractie in tumor/normale weefsel
- effect van bestraling en chemotherapie na zuurstof consumptie remmende drugs op tumor groei.

##### D. Vervanging, vermindering en verfijning.

2. Kunt U nadere informatie geven over het reeds uitgevoerde *in vitro*-onderzoek zulks in relatie tot de beoogde farmaca?

##### Reactie:

*In vitro is al vastgesteld dat sommige statines, een prolylhydroxylase remmer en de PPAR agonist fenofibraat een daling van de zuurstof consumptie in primaire GBM en U1242 en U87 GBM cel lijnen laten zien. Zoals in het PV vermeld, worden deze farmaca al gebruikt in mensen voor andere medische doeleinden. Het doel van de in vitro proeven is om die geneesmiddelen te identificeren die een nieuwe indicatie hebben namelijk een sterke daling van de zuurstof consumptie in tumor cellen.*

3. Is elke compound reeds *in vitro* getest?

##### Reactie:

*Nog niet elke compoud is in vitro getest en die compounds die gebruikt gaan worden in dierexperimenten zullen eerst in vitro getest worden.*

##### J. Humane eindpunten.

4. De maximale duur waarin een dier in het experiment verkeert wordt niet genoemd. Zou een dergelijke tijdsspanne niet tot onderdeel kunnen worden gemaakt van de humane eindpunten?

##### Reactie:

*Het eindpunt van tumor groei is een surrogaat eindpunt als gevolg van exponentiële tumor groei gemeten d.m.v. een combinatie van micro-CT en BLI zoals beschreven (J5). Als dieren 8 weken na implantatie geen reproduceerbare toename van tumor groei laten zien in een periode van 4 weken beschouwen we de chirurgie/tumor take als niet succesvol. Het dier zal worden geëuthanaseerd en d.m.v. behulp van histologie van het brein zal worden vastgesteld of er tumor cellen aanwezig zijn. "If within 8 weeks after tumor implantation no reproducible tumor growth within a period of 4 consecutive weeks can be observed the animal will be euthanized and histological analysis will be performed to determine the presence of tumor cells. Dit is toegevoegd in appendix (J7)*

5. De DEC-UM vraagt zich af of de totale uitval 10% is? Hoe verhoudt zich dit tot alle genoemde parameters aannemende dat het uitblijven van groei van een individuele neoplasie hieronder mede begrepen is?

##### Reactie:

*Dit percentage is bepaald aan de hand van eerdere orthotope GBM modellen in ons lab [redacted] et al., 2014,2015,2016). Uitval wordt met name verwacht in het uitblijven tumor groei. De U1242 is een bekend model in de literatuur en verwacht wordt dat dit model goed werkt.*



*Het is op voorhand niet te voorspellen hoe goed de primaire PDX modellen zullen aanslaan. Er wordt geen uitval verwacht als gevolg van bestraling, beeldvorming of behandeling met farmaca.*

**K. Classificatie van ongerief.**

6. Het lijkt erop of de anesthesie frequentie kan oplopen tot maximaal 3 x per week met een maximum van 15. Is dat correct en kan deze frequentie eventueel nog verminderd worden daar een GBM toch niet zo extreem hard lijkt te groeien?

**Reactie:**

*Dat is correct. Als de verdubbelingstijd van de GBM tumoren minder snel is dan het door ons gepubliceerde modellen waarop deze frequenties zijn gebaseerd dan kan de frequentie lager zijn.*

7. De DEC-UM verzoekt U het leed a.g.v. tumorgroei op te nemen in de lijst?

**Reactie:**

*Leed ten gevolge van tumor groei wordt gescoord als ernstig, echter aangezien dieren ge-euthanaseerd worden op vooraf bepaalde eindpunten, dus voordat ernstig ongerief ontstaat is dit in der werkelijkheid matig. Zie punt J en tabel 2. Dit is toegevoegd in appendix onder k: 3 Growth of intracranial brain tumor (moderate)*

8. De DEC-UM verzoekt U aan te geven hoe bloed wordt afgenomen?

**Reactie:**

*Bloed wordt afgenomen via saphena punctie beschreven volgens de NC3R richtlijnen*

- Datum antwoord; 03-03-2017
- Verstrekte antwoorden; zie bovenstaand
- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. **Eventuele adviezen door experts: N.V.T.**

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **JA**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.V.T.**

## **C. Beoordeling (inhoud)**

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

*Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC-UM vertrouwt erop 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-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.*



2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

*Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.*

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelestellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

*Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek.*

#### *Belangen en waarden*

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

*Het directe doel van het project is te onderzoeken of bekende, door de FDA goedgekeurde, geneesmiddelen kunnen worden gebruikt om de zuurstofconsumptie in een preklinisch model van GBM (tumordragende muizen) zodanig te verlagen dat de therapeutische effecten van chemo- en radiotherapie worden verbeterd.*

*Het uiteindelijke doel is het verbeteren van de behandeling van hersenkanker (GBM) door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen.*

*Het betreft hier een fundamenteel en translationeel project.*

*Er is binnen dit project wel een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC-UM acht het waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project.*

*De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn.*

*Uit de aanvraag blijkt dat nieuwe therapieën die tumorgroei vertragen en therapie-resistentie voorkomen noodzakelijk zijn om de levensverwachting van GBM patiënten te vergroten en dat daar op dit terrein ook behoefte aan is. Het therapeutische arsenaal bij GBM is op dit moment beperkt effectief. De DEC-UM is derhalve van mening dat het directe doel, het onderzoeken of bekende, door de FDA goedgekeurde, geneesmiddelen kunnen worden gebruikt om de zuurstofconsumptie in een preklinisch model van GBM (tumordragende muizen) zodanig te verlagen dat de therapeutische effecten van chemo- en radiotherapie worden verbeterd, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.*

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

*De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamenteel en toegepast wetenschappelijke project, dat gericht is op het verbeteren van de behandeling van hersenkanker (GBM) door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep, d.w.z. personen die hersentumoren ontwikkelen en hun naasten, de medische wetenschap en de farmaceutische industrie.*

*Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Ze zullen matig en ernstig ongerief ondervinden.*

*Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen en delen met de medisch-wetenschappelijke gemeenschap. De onderzoekers vergaren kennis over mogelijkheid om bekende, door de FDA goedgekeurde, geneesmiddelen in te zetten om de zuurstofconsumptie in een preklinisch model van GBM zodanig te verlagen dat de therapeutische effecten van chemo- en radiotherapie worden verbeterd.*

*Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Verbeterde therapie en vergrote levensverwachting. Daardoor zal ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.*

*Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. GBM is de meest voorkomende, en ook een zeer kwaadaardige en moeilijk te behandelen, vorm van hersentumor bij volwassenen. De levensverwachting van patiënten met een dergelijke hersentumor is beperkt en in de laatste jaren ook niet verbeterd. Mochten de reeds bekende en erkende geneesmiddelen een positief effect laten zien, dan zijn klinische studies met deze middelen op afzienbare termijn mogelijk.*

*De farmaceutische industrie is ook belanghebbende in onderhavig projectvoorstel. Mogelijkerwijs worden er nieuwe toepassingsgebieden ontsloten voor geneesmiddelen die al een heel ontwikkelings- en goedkeuringstraject hebben doorlopen.*

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

*Voor zover de DEC-UM de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.*

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

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

*Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.*

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







**Meer informatie**

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

**Datum:**

15 maart 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD107002017984

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

**Bijlagen:**

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur






**Datum:**  
15 maart 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD107002017984

### **Gegevens aanvrager**

#### Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10700  
Naam instelling of organisatie: Universiteit Maastricht  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:   
KvK-nummer: 50169181  
Straat en huisnummer: Minderbroedersberg 4-6  
Postbus: 616  
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT  
IBAN: NL04 INGB 0679 5101 68  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Maastricht

#### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
15 maart 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD107002017984

Gegevens plaatsvervangende v

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



Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 15 maart 2017  
Geplande einddatum: 15 maart 2022  
Titel project: Targeting Oxygen Metabolism to improve Glioblastoma outcome  
Titel niet-technische samenvatting: Verbeteren van de behandeling van hersenkanker door nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen  
Naam DEC: DEC-UM  
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD Maastricht  
E-mailadres DEC:

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen:  DEC-advies



**Ondertekening**

Naam:

Functie:

Plaats:

Datum:



Maastricht

1 maart 2017

**Datum:**

15 maart 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD107002017984



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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

AVD107002017984

**Bijlagen**

2

Datum 15 maart 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

### Factuur

Factuurdatum: 15 maart 2017

Vervaldatum: 14 april 2017

Factuurnummer: 170984

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002017984	€ 935,00

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

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 4 april 2017 17:30  
**Aan:** [Redacted]  
**CC:** [Redacted]  
**Onderwerp:** RE: AVD107002017984: Aanvullende informatie

Geachte [Redacted]

Wij hebben de aanvullende informatie in goede orde ontvangen.

Met vriendelijke groet,

**Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)**

.....  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....  
**T: 0900 2800028**  
**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)** (Let op: nieuw e-mail adres)

---

**Van:** [Redacted]  
**Verzonden:** dinsdag 4 april 2017 10:33  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** [Redacted]  
**Onderwerp:** FW: AVD107002017984: Aanvullende informatie

LS,

Is antwoord in deze vorm voldoende?

Met vriendelijke groet,

---

**From:** [Redacted]  
**Sent:** vrijdag 31 maart 2017 11:30  
**To:** [Redacted]  
**Cc:** [Redacted]  
**Subject:** Fwd: AVD107002017984: Aanvullende informatie

Beste [Redacted]

De dieren mogen zowel mannelijk als vrouwelijk zijn.

Laat je aub weten of je dit bericht hebt ontvangen door gestuurd naar de CCD

Met vriendelijke groet,

Begin forwarded message:



**From:** Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
**Subject:** AVD107002017984: Aanvullende informatie  
**Date:** 31 March 2017 at 21:40:02 GMT+13

Geacht [REDACTED]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Targeting Oxygen Metabolism to improve Glioblastoma outcome' met aanvraagnummer AVD107002017984. Wij hebben nog een vraag over uw aanvraag. In deze e-mail leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

-Uit uw aanvraag blijkt niet of u mannelijke en vrouwelijke dieren gaat gebruiken. U wordt verzocht dit alsnog aan te geven. Mocht u of alleen vrouwelijke of alleen mannelijke dieren gebruiken, wordt u verzocht toe te lichten waarom dat voor het behalen van uw doelstelling noodzakelijk is.

**Opsturen binnen veertien dagen**

U heeft veertien dagen de tijd om de ontbrekende informatie aan te leveren. De CCD zou uw aanvraag echter graag in de eerstvolgende CCD vergadering bespreken. Wij vragen u daarom de informatie uiterlijk donderdag 6 april 2017 aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

**Wanneer een beslissing**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
**Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)**

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

**T: 0900 2800028**

**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)** (Let op: nieuw e-mail adres)

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** vrijdag 14 april 2017 3:36  
**Aan:** Info-zbo  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Re: AVD107002017984: Aanvullende informatie  
**Bijlagen:** PV 2017-003 NTS\_V2.docx

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

De vergunninghouder is niet bereikbaar t/m 9 mei.  
Per abuis heeft u eerdere versie van de NTS ontvangen van de UM.

Ik stuur u nu daarom direct de aangepaste NTS. "uit het experiment worden gehaald" is vervangen door "geeeuthanaseerd". De veranderingen zijn in het grijs weergegeven.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd,

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

 Maastricht University

---

**From:** Info-zbo  
**Date:** Friday 14 April 2017 at 08:21  
**To:** [REDACTED]  
**Cc:** [REDACTED]  
**Subject:** RE: AVD107002017984: Aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

De CCD heeft uw aanvraag besproken en besloten deze te vergunnen.

De CCD is echter van mening dat u in de NTS het doden van dieren verhullend beschrijft waar het gaat om dieren die een humaan eindpunt bereiken. U geeft aan dat de dieren uit het experiment worden gehaald. U wordt verzocht hier aan te geven dat de dieren in dat geval gedood worden.

Pas wanneer wij de aangepaste NTS van u ontvangen kan uw aanvraag verder afgehandeld worden. De behandeling van uw aanvraag wordt daarom opgeschort totdat wij de aangepaste NTS hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,

  
Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)** (Let op: nieuw e-mail adres)

---

**Van:** Info-zbo

**Verzonden:** dinsdag 4 april 2017 17:30

**Aan:** 

**CC:** 

**Onderwerp:** RE: AVD107002017984: Aanvullende informatie

Geacht 

Wij hebben de aanvullende informatie in goede orde ontvangen.

Met vriendelijke groet,

  
Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)** (Let op: nieuw e-mail adres)

---

**Van:** 

**Verzonden:** dinsdag 4 april 2017 10:33

**Aan:** 'Info-zbo'

**CC:** 

**Onderwerp:** FW: AVD107002017984: Aanvullende informatie

LS,

Is antwoord in deze vorm voldoende?

Met vriendelijke groet,

---

**From:** 

**Sent:** vrijdag 31 maart 2017 11:30

**To:** 



Cc: [REDACTED]  
Subject: Fwd: AVD107002017984: Aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

De dieren mogen zowel mannelijk als vrouwelijk zijn.

Laat je aub weten of je dit bericht hebt ontvangen door gestuurd naar de CCD

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Begin forwarded message:

From: Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
Subject: AVD107002017984: Aanvullende informatie  
Date: 31 March 2017 at 21:40:02 GMT+13  
To [REDACTED]  
Cc [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Targeting Oxygen Metabolism to improve Glioblastoma outcome' met aanvraagnummer AVD107002017984. Wij hebben nog een vraag over uw aanvraag. In deze e-mail leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

-Uit uw aanvraag blijkt niet of u mannelijke en vrouwelijke dieren gaat gebruiken. U wordt verzocht dit alsnog aan te geven. Mocht u of alleen vrouwelijke of alleen mannelijke dieren gebruiken, wordt u verzocht toe te lichten waarom dat voor het behalen van uw doelstelling noodzakelijk is.

**Opsturen binnen veertien dagen**

U heeft veertien dagen de tijd om de ontbrekende informatie aan te leveren. De CCD zou uw aanvraag echter graag in de eerstvolgende CCD vergadering bespreken. Wij vragen u daarom de informatie uiterlijk donderdag 6 april 2017 aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

**Wanneer een beslissing**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)**

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

**T: 0900 2800028**  
**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)** (Let op: nieuw e-mail adres)



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616  
6200 MD MAASTRICHT



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  
AVD107002017984  
Bijlagen  
1

Datum 20 april 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Targeting Oxygen Metabolism to Improve Glioblastoma outcome" met aanvraagnummer AVD107002017984. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 04 april 2017 en 14 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 31 maart 2017 hebben wij u gevraagd of u mannelijke en vrouwelijke dieren gebruikt in uw project en op 13 april 2017 hebben wij u gevraagd de NTS aan te passen. Wij kunnen ons vinden in uw aanvullingen.

#### **Beslissing**

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

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

U kunt met uw project "Targeting Oxygen Metabolism to Improve Glioblastoma outcome" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 april 2017 tot en met 15 maart 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Beoordeling achteraf**

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

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 maart 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 spoedelsend 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:  
20 april 2017  
Aanvraagnummer:  
AVD107002017984



Centrale Commissie Dierproeven

**Datum:**  
20 april 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD107002017984

Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Universiteit Maastricht  
**Adres:** Postbus 616  
**Postcode en plaats:** 6200 MD MAASTRICHT  
**Deelnemersnummer:** 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 april 2017 tot en met 15 maart 2022, voor het project "Targeting Oxygen Metabolism to improve Glioblastoma outcome" met aanvraagnummer AVD107002017984, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. 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 13 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 maart 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 april 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 maart 2017, ontvangen op 13 maart 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 04 april 2017 en 14 april 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1. Intracranial GBM model for improving standard of care treatment using Hypoxic modification.</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	1.490	55% Ernstig 45% Matig	

### Voorwaarden

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

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

**Aanvraagnummer:**  
AVD107002017984

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

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





**Aanvraagnummer:**  
AVD107002017984

## 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 gehulsvest. 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 gehulsveste 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:**

AVD107002017984

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

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

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

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

#### **Beoordeling achteraf**

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