

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie 2006

DECNR: 2011-042

Herziene versie

Ontvangen: 20-04-2011

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
29-04-2011	Nieuw

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

Hoofdproject	CARIM	NUTRIM	Hersenen en gedrag	GROW	biomaterialen	Ander UM	Geen UM
--------------	-------	--------	--------------------	------	---------------	----------	---------

Deelproject							
-------------	--	--	--	--	--	--	--

Financieel beheerder	
----------------------	--

Budgetnummer	30943120E (METOXIA)
--------------	---------------------

Titel van het onderzoek:

Can radiotherapy enhance the immunotherapeutic effect of L19-IL2?

startdatum 1 mei 2011 einddatum 9 30 april 2015 Duur van de proef¹⁰: 4 maanden

	Naam	Tel (+ Tel privé enkel VO, VVO en VM)	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. groep /afdeling
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)				Art.9	
2. Vervanger VO (VVO)				Art.9	
3. overige uitvoerenden				Art. 9	
4. overige uitvoerenden				Art.12	

t

Diergroep	DG1	DG2	DG3	DG4	DG5	DG6	DG7
ctrl/exp/sham	exp	exp	exp	exp	Exp	exp	exp
Diersoort	01	01	01	01	01	01	01
Stam	129/Sv	Balb/c	129/Sv	Balb/c	NMRI nu/nu	Balb/c nu/nu	RAG2-KO
Construct / mutatie ?	-	-	-	-	-	-	-
Herkomst (leverancier) *	01	01	01	01	01	01	01
Aantal	30	60	125	208	38	76	114
Geslacht	m/v	m/v	m/v	m/v	m/v	m/v	m/v
Dieren immuuncompetent ?	ja	ja	ja	ja	nee	nee	nee
Leeftijd/gewicht	2m/28-30g	2m/28-30g	2m/28-30g	2m/28-30g	2m/28-30g	2m/28-30g	2m/28-30g
Doel van de proef *	30	30	30	30	30	30	30
Belang van de proef *	01	01	01	01	01	01	01
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01	01	01	01
Bijzondere technieken *	01	01	01	01	01	01	01
Anesthesie *	04	04	04	04	04	04	04
Pijnbestrijding *	01	01	01	01	01	01	01
Mate ongerief *	04	04	05	05	05	05	05
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01	01	01	01

* VHI-coderingen zie bijlage

2 Verantwoording

Aanvraag dierproef DEC-UM (kaders zijn licht flexibel, maar het geheel is max. 5 pag. versie 2006)

Titel: Can radiotherapy enhance the immunotherapeutic effect of L19-IL2?

1. Doel van de proef.

De vorming van nieuwe bloedvaten is vereist voor de groei van tumoren en hierbij is het extradomein B (ED-B) van fibronectine vereist.

Recent is een antilichaam fragment ontwikkeld (L19) dat kan binden aan ED-B. L19 kan hierdoor worden gebruikt als een marker voor de nieuwvorming van vaten in tumoren. Eerst willen we binding van L19 aan de tumor aan te tonen, dit gaan we doen met behulp van immunohistochemie. Daarnaast willen we L19 koppelen aan een radioactieve stof (jodium-124) om niet-invasieve beeldvorming (PET) en biodistributie mogelijk te maken.

Voor therapeutische doeleinden kan L19 gebonden worden aan interleukine 2 (IL2). IL2 speelt een essentiële rol in de activatie van een immuunrespons. IL2 heeft geen direct therapeutisch effect maar kan tumor regressie veroorzaken door een immuunrespons te stimuleren. Behandeling met L19-IL2 als monotherapie gaf in eerder onderzoek al veelbelovende resultaten.

Door bestraling ondergaat een tumor veranderingen op micro-niveau en wordt er een ontstekingsreactie veroorzaakt. Deze veranderingen kunnen benut worden om de effecten van immunotherapie te vergroten. Naar onze verwachting zal een combinatie van deze specifieke immunotherapie met bestraling een betere behandeling van de tumor tot gevolg hebben.

Er is steeds meer bewijs dat radiotherapie ook biologische effecten teweeg brengt buiten het daadwerkelijke bestralingsgebied. We willen onderzoeken of dit systemisch effect van de bestraling aanwezig is in combinatie met immunotherapie.

Deze studie zal bestaan uit vier doelstellingen: namelijk een observationele (O) en 3 therapeutische (T) doelstellingen.

Observationele doelstelling:

O. Binding van van L19 aantonen m.b.v. PET beeldvorming, biodistributie en immunohistochemie.

Therapeutische doelstelling:

T1. Bewijs effectiviteit immunotherapie met L19-IL2 en de meerwaarde van additionele radiotherapie

T2. Bewijs een effect van radiotherapie buiten het bestralingsgebied.

T3. Onderzoek het effect van de voorafgaande therapie bij het tot stand brengen van een nieuwe tumor.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang

Kanker is (een van) de meest voorkomende doodsoorzaak ter wereld. Bestraling is een veel toegepaste behandeling tegen kanker. Immunotherapie kan het effect van de bestraling versterken, waardoor de kans op een succesvolle behandeling groter wordt. Dit onderzoek kan een fundamentele bijdrage leveren aan het optimaliseren van de behandeling voor kankerpatiënten.

3. Alternatieven

Humane tumoren worden beïnvloed door het complexe organisme waarin ze groeien. De vorming van nieuwe vaten in de tumor, de daarmee gepaard gaande toename van ED-B en de 3D structuur van de tumor wordt bepaald door het organisme waarin de tumor groeit. Therapie met L19-IL2 maakt daarnaast gebruik van het immuunsysteem van het organisme, welke onmogelijk na te bootsen is in vitro. Door waar mogelijk gebruik te maken van twee tumoren per muis wordt het aantal muizen gereduceerd.

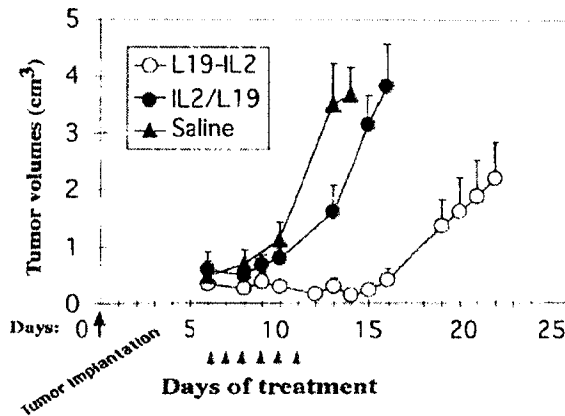
4. Ethische afweging.

Gemiddeld wordt er een ongerief score van 5 verwacht bij de verschillende groepen. Gedurende de hele studie wordt er gestreefd naar een zo laag mogelijk ongerief en minimalisering van pijn en lijden. De beeldvorming die tijdens deze studie zal worden gebruikt, is niet invasief, maar de behandeling die het dier daarvoor ondergaat kan echter wel voor mogelijk ongerief zorgen. Het belang van dit onderzoek weegt, naar onze mening, echter meer aangezien dit soort onderzoek leidt tot een betere behandeling van de kankerpatiënt.

3 Wetenschap

5. Wetenschappelijke onderbouwing

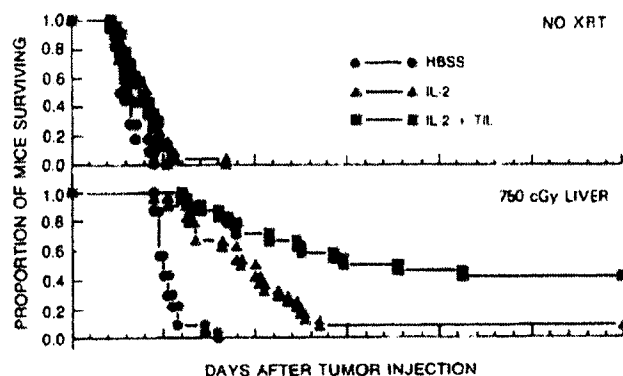
Neoangiogenese is vereist voor de groei van tumoren. Een van de meest selectieve antigenen geassocieerd met neoangiogenese en tumor groei is het extradomein B (ED-B) van fibronectine. Recent is een antilichaam fragment ontwikkeld (L19) dat kan binden aan ED-B. L19 kan hierdoor gebruikt worden als een marker voor de neovascularisatie in tumoren (Wagner et al. 2008). L19 kan gebonden worden aan Jodium-124 om op deze manier met niet-invasieve beeldvorming aan te tonen dat L19 bindt aan de tumor (Tijink et al. 2009).



Voor immunotherapie kan L19 gebonden worden aan interleukine 2 (IL2). IL2 speelt een essentiële rol in de activatie van een immuunrespons. IL2 heeft geen direct therapeutisch effect, maar kan tumor regressie veroorzaken door een cell-mediated immuunrespons te stimuleren (Carnemolla et al. 2002). Verder werd er ook aangetoond dat systemische toediening van IL2 leidde tot toxiciteit (Demaria et al 2005). Door de koppeling van IL2 met L19, wordt specifiek de tumor bereikt en systemische toxiciteit vermeden door lagere dosering mogelijk te maken. Behandeling met L19-IL2 gaf in eerder onderzoek al veelbelovende resultaten, waarbij een duidelijke tumor groei vertraging werd waargenomen in vergelijking met de enkelvoudige behandelingen (figuur 1).

Figuur 1 Remming van tumorgroei door L19-IL2 (Carnemolla et al. 2002)

Radiotherapie veroorzaakt een ontstekingsreactie en veranderingen op het micro-niveau van de tumor (Demaria et al 2005). Deze veranderingen kunnen we benutten om de effecten van immunotherapie te vergroten (Matsumura et al. 2008). 21 jaar geleden is er al een studie gedaan naar de combinatie van



radiotherapie met een systemische toediening van IL2, waarbij een combinatie van beide een betere kans op overleving gaf (Cameron et al., figuur 2). Door bestraling te combineren met specifiek gerichte L19-IL2 behandeling, verwachten we een hogere kans op overleving, maar geassocieerd met minder toxiciteit.

Figuur 2: Overleving met (750 cGy) en zonder bestraling (no XRT) voor drie behandelgroepen, zout oplossing (HBSS), interleukine 2 (IL-2) en IL-2 met tumor-infiltrerende lymfocyten (TIL) (Cameron et al. 1990).

Er is steeds meer bewijs dat radiotherapie ook biologische effecten teweeg brengt buiten het daadwerkelijke bestralingsgebied (Formenti et al. 2009, Demaria et al. 2004). Aangezien het immuunsysteem deze effecten kan waarnemen, kan immunotherapie in combinatie met bestraling nieuwe behandelmogelijkheden aanbieden voor tumoren (uitzaaiingen) of delen hiervan die niet bestraald kunnen worden.

Tijdens deze studie willen we gebruik maken van twee cellijnen waarvan bekend is dat ze ED-B tot expressie brengen (F9 teratocarcinoma en C51 colon carcinoma) en een cellijn waarbij het systemisch effect van bestraling aangetoond is (67NR mammary carcinoma, Demaria et al. 2004)

De eerste doelstelling (O) van deze studie is het valideren van deze cel modellen door aan te tonen dat er specifieke binding van L19 is in deze tumoren, met behulp van niet-invasieve beeldvorming, biodistributie en Immunohistochemie.

In de **tweede doelstelling (T1)** willen we bewijzen dat een combinatie van immunotherapie (L19-IL2) met radiotherapie een beter therapeutisch effect geeft dan beide behandelingen afzonderlijk.

In de **derde doelstelling (T2)** willen we aantonen dat radiotherapie naast een lokaal effect ook een systemisch effect heeft.

Mocht de therapie zo goed werken dat de tumor verdwijnt, willen we in de **laatste doelstelling (T3)** testen of

het immuunsysteem nieuw geïnjecteerde tumorcellen herkent en tumorgroei nogmaals tegengaat.

6. Wetenschappelijke beoordeling

Dit DEC protocol is wetenschappelijk benoedeeld door het Leadership Team onder leiding van
en vervolgens goedgekeurd.

5 Proefdier

7. Proefdier keuze

7a. Soort, stam / herkomst / eindbestemming

In een eerste stap willen we voor dit experiment gebruik maken van immuuncompetente 129/SvHsd muizen voor F9 teratocarcinoma tumoren en Balb/c muizen voor C51 colorectale en 67NR borst tumoren. Het intacte immuunsysteem zal bijdragen aan het effect van de immuuntherapie. In eerdere studies met L19-IL2 bleken deze dieren geschikt. (Carnemolla et al. 2002, Borsi et al. 2002, Borsi et al. 2003, Halin et al. 2002). Als in deze dieren een behandelingswaarde wordt waargenomen, willen we in een tweede stap de experimenten uitvoeren in immuungecompromiteerde NMRI-nu (nu/nu) en Balb/c nude (nu/nu) muizen. Deze muizen hebben wel NK cellen, geen T- of B-cellen, dus door gebruik te maken van deze muizen willen we uitzoeken of de mogelijke immuunrespons T en B cel afhankelijk is. In een derde stap willen we de experimenten uitvoeren in RAG2-knock-out muizen. Deze muizen zijn immuundeficiënt, waardoor de immuunrespons niet kan bijdragen aan de behandeling. De combinatie van deze experimenten zorgt ervoor dat we kunnen onderzoeken of de behandeling NK of T-cel afhankelijk is. De muizen zullen geleverd worden door een van de reguliere UM leveranciers (Charles River of Harlan). De muizen zullen aan het eind van het experiment gedood worden.

7b. Sexe

De sexe van de dieren is in dit experiment niet van belang.

7c. Aantallen

De doelstellingen worden eerst onderzocht in de immunocompetente muizen 129/Sv en Balb/c. Alleen als er een behandelingswaarde wordt waargenomen, wordt op basis van de resultaten, experimenten uitgevoerd immunogecompromiteerde NMRI nu/nu en Balb/c nu/nu, en vervolgens in de immuundeficiënte RAG2-KO muizen

Observationeel:

O. Beeldvorming en verdeling van L19 m.b.v. PET beeldvorming en biodistributie.

Met behulp van biodistributie willen we aantonen dat L19 bindt aan de tumor, de verdeling van L19 bepalen en daarnaast willen we met niet-invasieve beeldvorming de binding van L19 aan de tumor visualiseren. Dit wordt vergeleken met de biodistributie en beeldvorming van een controle antilichaam.

Gebaseerd op de literatuur is het beoogde verschil in de groepen (tumoren) 30%, de variabiliteit binnen de tumoren is 17%. Gebruik makende van de statistische formule $N = 2(z_\alpha + z_\beta)^2 \times (s/d)^2$ met een power van 80% ($F = 15,7$; uitleesparameter voor de power is het verschil in opname tussen L19 en het controle antilichaam) kunnen we het aantal tumoren bepalen om per groep significantie ($p < 0,05$) te verkrijgen ($N = 5,0$). Rekening houdende met een uitvalspercentage van 10% (geen tumorvorming) zijn er 6 ($N = 5,6$) tumoren per groep nodig. Aangezien er binnen deze doelstelling gebruikt gemaakt kan worden van 2 tumoren per muis voldoen 3 muizen per groep. Er zijn vijf verschillende meetmomenten namelijk 3, 6, 24, 48 en 72 hr. p.i.

We vragen 3 muizen x 5 tijdstippen x 2 groepen (L19/controle) = 30 muizen per cellijn (zie tabel op pagina 7). In totaal vragen wij 30 x 3 (cellijnen) = 90 muizen voor deze doelstelling.

Therapie:

T₁ Bewijs effectiviteit immunotherapie met L19-IL2 en de meerwaarde van additionele radiotherapie

Gebaseerd op de literatuur en eigen gegevens is het beoogde verschil in behandelingsgroepen (tumoren) 25%, de variabiliteit binnen de tumoren is 18%. Gebruik makende van de statistische formule $N = 2(z_\alpha + z_\beta)^2 \times (s/d)^2$ met een power van 80% ($F = 15,7$; uitleesparameter voor de power is het verschil in opname L19 met het daaraan gekoppeld therapeutisch effect) kunnen we het aantal tumoren bepalen om per groep significantie ($p < 0,05$) te verkrijgen ($N = 8,1$). Rekening houdende met een uitvalspercentage van 10% (geen tumorvorming) zijn er 9 ($N = 9,0$) tumoren per groep nodig. Aangezien er binnen deze doelstelling gebruik gemaakt kan worden van 2 tumoren per muis (die een identiek behandeld worden) voldoen 5 muizen per groep en zorgt dit voor een aanzienlijke vermindering in het aantal proefdieren. De behandeling zal bestaan uit immuuntherapie (controle, IL2, L19 of L19-IL2) en radiotherapie (controle, voor, tijdens en na immuuntherapie). Op basis van de resultaten na twee cellijnen wordt, om het aantal dieren te reduceren, alleen de beste combinatie immuun/radiotherapie en een controle gebruikt voor de andere cellijn.

Wij vragen 5 muizen x 4 groepen (immunotherapie) x 4 groepen (radiotherapie) x 2 (tumoren) = 80 muizen voor de eerste twee experimenten/cellijnen.

Wij vragen 5 muizen x 2 groepen (immunotherapie, alleen beste/controle) x 2 groepen (radiotherapie, alleen beste/controle) = 20 muizen voor de andere experimenten/cellijnen.

In totaal vragen wij voor deze doelstelling 80×2 (eerste twee experimenten) + 20×7 (overige experimenten) = 300 muizen voor deze doelstelling.

T₂ Bewijs het additioneel effect van radiotherapie buiten het bestralingsgebied.

Binnen deze doelstelling werken we met bilaterale tumoren, maar we bestralen slechts 1 tumor en bekijken het immunogeen effect van de bestraling in combinatie met de beste immuuntherapie op de andere tumor. Op basis van de resultaten van doelstelling T1 zal de beste immuuntherapie gecombineerd worden met het beste bestraling tijdstip. Voor dit experiment vragen wij 9 muizen per groep (beoogd verschil 25%, variabiliteit 18%, power 80% (uitleesparameter van de power is het verschil in effect buiten het bestralingsgebied) en uitval 10%; $N=9.0$).

Voor deze doelstelling vragen wij 9 muizen per cellijn/experiment.

In totaal vragen wij voor deze doelstelling 9 muizen x 9 (experimenten) = 81 muizen

Subdoelstelling T_{2x}: In het geval dat er geen of alleen een miniem effect op de onbestraalde tumor waarneembaar is worden 2 groepen toegevoegd die behandeld worden met GMCsF (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor) of ipilimumab om de immuunrespons te verhogen. Dit experiment wordt alleen uitgevoerd in de immuuncompetente muizen.

We vragen 9 muizen x 2 groepen (GMCsF of ipilimumab) = 18 muizen per cellijn

In totaal vragen wij voor deze doelstelling 18 muizen x 3 (cellijnen) = 54 muizen

Subdoelstelling T_{2y}: In het geval dat er wel een effect op de onbestraalde tumor waarneembaar is, willen we controleren of het systemisch effect van de radiotherapie tumor specifiek is. Hiervoor worden er twee groepen Balb/c muizen toegevoegd, waarbij in een muis twee verschillende tumoren geïnjecteerd worden (C51 en 67NR). In een groep wordt de C51 tumor bestraald in de andere de 67NR tumor.

In totaal vragen wij voor deze doelstelling 9 muizen per groep x 2 groepen (bestralen C51 of 67NR tumor) = 18 muizen (alleen voor de Balb/c muizen).

T₃. Onderzoek het effect van de voorafgaande therapie bij het induceren van een nieuwe tumor.

Deze doelstelling is enkel van toepassing als in de voorgaande doelstellingen een behandeling zo effectief is dat de tumor verdwijnt. Bij deze doelstelling wordt op een unilaterale tumor de beste behandelingscombinatie toegepast. Na de behandeling (dus wanneer de tumor volledig is verdwenen) worden nieuwe tumorcellen contra-lateraal geïnjecteerd, om na te gaan of er een immuun 'memory' is ontstaan. Om de memory CD8 T-cellen te stimuleren wordt (alleen de immuuncompetente muizen) een groep met rapamycine toegediend. Voor dit experiment vragen wij 9 muizen per groep (beoogd verschil 25%, variabiliteit 18%, power 80% (uitleesparameter van de power is het verschil in effect bij de groei van de 2^{de} tumor) en uitval 10%; $N=9.0$).

We vragen 9 muizen x 2 groepen (rapamycine/controle) = 18 muizen per cellijn voor de immuuncompetente muizen

We vragen 9 muizen x 1 groep (rapamycine heeft geen effect in immuundeficiente muizen) = 9 muizen per cellijn voor de immuundeficiente muizen.

In totaal vragen wij voor deze doelstelling 18×3 (cellijnen in immuuncompetente muizen) + 9×6 (cellijnen in immuungecompromiteerde of deficiente muizen) = 108 muizen

Voor deze DEC vragen wij:

O: 90 muizen

T1: 300 muizen

T2: 81 muizen

T2x: 54 muizen

T2y: 18 muizen

T3: 108 muizen

Totaal aantal muizen: 651 muizen.

Zie voor een overzicht van het aantal muizen de tabellen op de volgende pagina.

Tabel 1: Onderbouwing van het aantal aangevraagde muizen voor de observationele doelstelling.

Muizen	Cellijn	Doelstelling	
		O	O-Totaal per diergroep
		N x tijdstippen x ¹²⁴ I-L19/controle	
1. 129/Sv	F9	3 x 5 x 2 = 30	30 = DG1
2. Balb/c	C51	3 x 5 x 2 = 30	60 = DG2
2. Balb/c	67NR	3 x 5 x 2 = 30	
Totaal		90	

N = aantal muizen per groep

Tabel 2: Onderbouwing van het aantal aangevraagde muizen voor de observationele doelstelling. Resultaten uit voorgaande experimenten worden meegenomen in de volgende experimenten, om het aantal muizen te reduceren. Het aantal bepaalde muizen is een maximum*.

Muizen	Cellijn	Doelstelling					
		T1	T2	T2x**	T2y***	T3□	T-totaal per diergroep
		N x IT x RT	N x beste combi IT+RT	N x GMC-SF/ ipilimumab	N x bestraling C51/67NR	N x +/- rapamycine	
1. 129/Sv	F9	5 x 4 x 4 = 80	9 x 1 = 9	9 x 2 = 18		9 x 2 = 18	125 = DG3
2. Balb/c	C51	5 x 4 x 4 = 80	9 x 1 = 9	9 x 2 = 18		9 x 2 = 18	
2. Balb/c	67NR	5 x 2 x 2 = 20*	9 x 1 = 9	9 x 2 = 18	9x2 = 18	9 x 2 = 18	208= DG4
3. NMRI nu/nu	F9	5 x 2 x 2 = 20*	9 x 1 = 9	-		9 x 1 = 9□□	38= DG5
4. Balb/c nu/nu	C51	5 x 2 x 2 = 20*	9 x 1 = 9	-		9 x 1 = 9□□	
4. Balb/c nu/nu	67NR	5 x 2 x 2 = 20*	9 x 1 = 9	-		9 x 1 = 9□□	76=DG6
5 RAG2-KO	F9	5 x 2 x 2 = 20*	9 x 1 = 9	-		9 x 1 = 9□□	
5. RAG2-KO	C51	5 x 2 x 2 = 20*	9 x 1 = 9	-		9 x 1 = 9□□	
5. RAG2-KO	67NR	5 x 2 x 2 = 20*	9 x 1 = 9	-		9 x 1 = 9□□	114=DG7
Totaal		300	81	54	18	108	

N = aantal muizen per groep

IT = immuuntherapie

RT = radiotherapie

* = Experimenten in de nu/nu muizen (DG5 en DG6) en RAG2-KO muizen (DG7) worden alleen uitgevoerd bij een waargenomen behandel-effect in de immunocompetente muizen (DG 3 en DG4). De combinatie immunocompetente, immunogecompromiteerde en immuundeficiente muizen is gekozen om te bepalen of het behandel-effect NK of T-cel afhankelijk is.

* = Alleen de beste IT en RT (op basis van eerste twee cellijnen) en een controlegroep om het aantal dieren te reduceren.

** = Subdoelstelling: alleen wanneer er geen of alleen een minimaal effect waarneembaar is bij T2

*** = Subdoelstelling: alleen als er een effect waarneembaar is bij T2.

□ = Deze doelstelling wordt alleen uitgevoerd wanneer de tumor verdwijnt bij een van voorgaande therapieën.

□□ = Rapamycine heeft effect op de hoeveelheid en differentiatie van CD8 T-cellen, gezien de nu/nu muizen en RAG2-KO muizen geen T-cellen hebben heeft bij deze groepen toediening van rapamycine geen nut.

9 Dierproef

8. Experiment

Algemeen

Alle experimenten beschreven in dit onderzoek gebeuren rekening houdende met de code of practice met betrekking tot dierproeven binnen kankeronderzoek (Code of Practice: dierproeven in het kankeronderzoek. Inspectie W&V). Eveneens werden de humane eindpunten op basis van dit document beargumenteerd.

Voor huidig onderzoek wordt gewerkt met 3 type muis tumor cellen: F9 teratocarcinoma, C51 colon carcinoma en 67NR mammacarcinoma. Deze worden geblindeerd subcutaan ingespoten ($3,0 \times 10^6$ F9 cellen, 10^6 C51 cellen of 10^5 67NR cellen) tijdens fixatie van het proefdier ter verkrijging van een xenograft tumor. De geïnjecteerde cellen zullen gescreend op muispathologische organismen. Metastasering van de tumoren is zowel uit eigen ervaring en de literatuur erg onwaarschijnlijk. Tijdens het experiment worden de subcutaan geïmplanteerde tumoren, wanneer voelbaar, 3-7x/week (afhankelijk van groeisnelheid) gemeten terwijl de muis gefixeerd wordt. De grootte van de tumor wordt bepaald gebruik makende van een Vernier calliper, in 3 orthogonale tumor diameters A, B en C, elk gecorrigeerd voor de huiddikte. Het tumorvolume wordt dan berekend door gebruik te maken van de formule $A \times B \times C \times \pi/6$ omdat tumoren elliptisch groeien.

In een eerste stap willen we voor dit experiment gebruik maken van immuuncompetente (129/SvHsd en Balb/c) muizen. Het intacte immuunsysteem zal bijdragen aan het effect van de immuuntherapie. In eerdere studies met L19-IL2 bleken deze dieren geschikt. Op basis van de behaalde resultaten willen we in een tweede stap de experimenten uitvoeren in immuungecompromitteerde (NMRI-nu nu/nu en Balb/c nu/nu) muizen. Op deze manier kan het effect van een beperkt immuunsysteem (wel NK cellen, vrijwel geen B en T cellen) onderzocht worden. Als derde stap worden immuundeficiënte RAG2-KO muizen gebruikt. De combinatie van deze experimenten zorgt ervoor dat we kunnen onderzoeken of de behandeling NK of T-cel afhankelijk is.

Doelstelling O: binding L19 aantonen met biodistributie, beeldvorming en immunohistochemie

In deze doelstelling willen we de verdeling van L19 in het lichaam bepalen (biodistributie) en L19 binding met niet-invasieve beeldvorming en immunohistochemie weergeven. Muizen worden bilateraal geïnjecteerd met tumorcellen. De niet-invasieve beeldvorming en biodistributie wordt toegepast door injectie van radioactief gelabeld L19 (^{124}I -L19, $1\mu\text{g/kg}$, 3.7 MBq) of een controle antilichaam fragment ($1\mu\text{g/kg}$, 3.7 MBq) via de staartvene. Twee dagen voor de start van het experiment wordt 0.1% kaliumjodide aan het drinkwater toegevoegd om opname van radioactief jodium in de schildklier te voorkomen. PET/CT tumor beeldvorming (onder isofluraan anesthesie: inductie: 4%, onderhoud: 1-2%) gebeurt wanneer de tumoren een volume bereikt hebben van 250 mm^3 .

Er zijn vijf groepen dieren.

Om het ongerief (PET beeldvorming, anesthesie) te verminderen krijgen de eerste vier groepen maar één PET-scan op 3, 6, 24 of 48 uur p.i. Na de acquisitie worden de dieren, opgeofferd voor biodistributie. Om toch een kinetische analyse mogelijk te maken wordt in de laatste groep herhaaldelijk PET beeldvorming gedaan op de verschillende tijdstippen (3, 6, 24, 48, 72 uur p.i.). Na de laatste acquisitie worden deze dieren opgeofferd voor biodistributie.

Zie voor een overzicht de tijdlijn in de bijlage.

De duur van deze doelstelling wordt bepaald door de groeisnelheid van de tumoren en zal maximaal 2 maanden duren.

Doelstelling T1: bewijs effectiviteit immunotheapie en meerwaarde bestraling.

Om de effectiviteit van de immuuntherapie te bewijzen en de optimale timing van de radiotherapie te onderzoeken worden muizen bilateraal (om het aantal dieren te reduceren) geïnjecteerd met tumorcellen. Wanneer een volume van ongeveer 250 mm^3 bereikt wordt, worden de muizen gerandomiseerd in de verschillende behandelingsgroepen.

In de immuuncompetente muizen (eerste twee cellijnen) zal de groeivertraging van de tumor bepaald worden voor alle combinaties van immuuntherapie en radiotherapie. De immuuntherapie bestaat uit een behandeling op dag 1, 3 en 5 waarbij een zoutoplossing, L19 (0.53 mg/kg), IL2 (0.27 mg/kg) of L19-IL2 (0.8

mg/kg) intraveneus wordt toegediend. De radiotherapie bestaat uit een controlegroep (geen bestraling), bestraling voor, bestraling tijdens of bestraling na de immuuntherapie. Een radiotherapie behandeling bestaat uit een tumor bestraling van 10 Gy, onder ketamine-xylazine (100 mg/kg + 10 mg/kg). De tijd om 4x het therapie start volume te bereiken wordt gebruikt als eindpunt, zodat we de specifieke groeivertraging kunnen bepalen. Dit bepaald ook de duur van deze doelstelling.

Op basis van deze resultaten zal de beste combinatie immuun/radiotherapie en een controlegroep getest worden bij de 3^e cellijn immuuncompetente muizen en de immuungecompromitteerde en immuundeficiënte muizen.

Doelstelling T2: bewijs effect radiotherapie buiten bestralingsgebied

Er is steeds meer bewijs dat radiotherapie ook biologische effecten teweeg brengt buiten het daadwerkelijke bestralingsgebied. We willen onderzoeken of er een systemisch effect van bestraling is in combinatie met immuuntherapie. Dit willen we onderzoeken door muizen bilateraal te injecteren met tumorcellen. Wanneer een tumorvolume van ongeveer 250 mm³ bereikt is, worden beide tumoren behandeld met de beste immuuntherapie zoals bepaald in doelstelling T1, één van beide tumoren bestraald (beste timing, doelstelling T1). Als er een systemisch effect van bestraling is verwachten we ook een reductie van de tumor aan de niet-bestraalde zijde die groter is dan de immuuntherapie alleen.

Subdoelstelling T2x: immuunrespons verhogen

Mocht er geen of alleen een minimaal effect waarneembaar zijn in de niet-bestraalde tumor dan wordt, om de immuunrespons te verhogen, GMCsf (8 µg/kg, i.p.) 7 dagen opeenvolgend toegediend of eenmalig ipilimumab (10 mg/kg, i.v.) toegediend.

Subdoelstelling T2y: effect tumorspecifiek?

Mocht er wel een effect waarneembaar zijn in de niet-bestraalde tumor, willen we onderzoeken of dit effect tumor specifiek is. Bilateraal worden C51 en 67NR tumoren geïnduceerd in Balb/c muizen. De beste immuuntherapie wordt toegediend. In een groep wordt de C51 tumor bestraald, in de andere groep de 67NR tumor. Het effect op de niet-bestraalde tumor wordt bestudeerd.

De controlegroep is tijdens doelstelling T1 al bepaald.

De tijd om 4x het therapie start volume te bereiken wordt gebruikt als eindpunt, zodat we de specifieke groeivertraging kunnen bepalen. Dit bepaalt ook de duur van deze doelstelling.

Doelstelling T3: memory?

Als een van de therapeutische combinaties zo effectief is dat de tumor verdwijnt, willen we onderzoeken of het immuunsysteem in staat is nieuwe tumorcellen te herkennen en tumorgroei tegen te gaan, als een soort van 'memory'. Voor deze doelstelling willen we de muizen unilateraal injecteren met tumorcellen. Deze tumor wordt met de beste therapie behandeld. Als de tumor verdwenen is worden aan de contralaterale zijde opnieuw tumorcellen geïnjecteerd om te onderzoeken of deze tumorgroei ook geremd wordt. Het is aangetoond dat rapamycine memory CD8 T-cel aantal en differentiatie kan vergroten (Araki K. et al. 2009). Daarom wordt een groep immuuncompetente muizen (die beschikken over T-cellen) toegevoegd waarbij additioneel rapamycine toegediend wordt aansluitend aan de bestraling (75µg/kg, i.p. 7 dagen opeenvolgend).

Einde experiment

Wanneer een dier zijn laatste scan heeft gehad (doelstelling O); de tumor 4x het therapie start volume heeft bereikt (doelstelling T1, T2, T3) of wanneer de gezondheidstoestand van een dier verslechterd, zal het dier onder sedatie (isofluraan) worden ge-euthanaseerd. Een uur voor het euthanaseren van de dieren wordt door middel van een i.p. injectie pimonidazole (60 mg/kg, ter indicatie van hypoxische gebieden) en BrdU (30 mg/kg, ter indicatie van prolifererende cellen) toegediend. 1 minuut voor euthanaseren, wanneer het dier nog onder algehele anesthesie is, wordt door middel van een i.v. injectie Hoechst 33342 (15 mg/kg, ter analyse van de 'microvessel density') toegediend.

Op het einde van de proef wordt het proefdier ge-euthanaseerd en worden de tumoren verwijderd en verwerkt voor histologische analyse.

Er is geen mogelijkheid om historische controles te gebruiken omdat deze experimenten nooit eerder op deze wijze zijn uitgevoerd. Controle groepen bekomen binnen doelstelling T1 worden echter wel gebruikt voor de andere doelstellingen (T2 en T3).

Zie voor een overzicht van de therapie experimenten de flowchart in de bijlage.

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

Anesthesie gebeurt in overeenstemming met het standaard protocol van het CPV van de Universiteit van Maastricht. Anesthesie wordt uitgevoerd door middel van isofluraan inhalatie (*inductie: 4%, onderhoud: 1-2%*) bij de fluorescentie beeldvorming. Een intraperitoneaal combinatie injectie *100 mg/kg + 10 mg/kg* ketamine/xylazine mix (= 1 injectie) wordt toegediend, 10 minuten voor bestraling. Detomidine en dexmedetomidine kunnen als alternatief voor xylazine gebruikt worden, dit na overleg met de art. 14 functionaris. Het gebruik van atipamezole hierbij dient ook te worden overlegd met de art. 14 functionaris. Tijdens de duur van anesthesie wordt oogzalf aangebracht teneinde voorkoming van uitdroging van de ogen.

9b. Pijnbestrijding

Tijdens deze studie verwachten we dat de dieren geen significante pijn ondervinden. De subcutane injectie om de tumorcellen te injecteren en vervolgens de groei van de tumoren zal naar verwachting en ervaring geen pijn met zich mee brengen waardoor pijnmedicatie niet noodzakelijk is. Beeldvorming en bestraling op zich veroorzaken geen significante pijn.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- De dieren worden ge-euthanaseerd (onder isofluraan sedatie) door cervicale dislocatie bij ziekte (uitdroging en vermagering ($>20\%/dag$), open wonden bij necrose en wanneer de maximaal toegestane tumorlast (2 cm^3) wordt bereikt.
- Humane eindpunten waarbij euthanasie gebeurd zijn ziekte (vast te stellen door onderzoeker, proefdierversorger) en wanneer de maximaal toegestane tumorlast (2 cm^3) wordt bereikt.
- Het proefdier wordt onmiddellijk ge-euthanaseerd wanneer er sprake is van een open wond bij sterk extern necrotiserende tumoren (komt vooral voor bij grotere tumoren) en wanneer er vocht lekt uit deze open wond.

10a. Ongerief

Tumorimplantatie (matig = 03): 1x voor doelstelling O, T1 en T2, 2x voor doelstelling T3.
Tumorcellen worden onder fixatie subcutaan geïnjecteerd.

Tumorgroei en tumor load (matig = 03): gedurende het hele experiment = max 4 maanden en gelijk voor alle doelstellingen

Experimenten starten bij een volume van 250 mm³. De groei van tumoren veroorzaakt op zich weinig ongerief. We verhogen echter de ongerief score omdat het eindpunt van de studie de tijd is om 4x het start volume bij de start van de therapie te bereiken. Hierdoor werken we met relatief grote tumoren, wat het aangegeven ongerief voor deze tumor load verklaart.

Metten van tumorgrootte (matig = 03 3-7x per week gedurende het hele experiment = max 4 maanden): Gelijk voor alle doelstellingen. Het meten van de tumor op zich zal zeer gering ongerief te weeg brengen, maar het herhaaldelijk fixeren zal zorgen voor matig ongerief.

Beeldvorming (matig/ernstig = 04): Alleen doelstelling O, 1 of 5 keer.

Onder anesthesie (isofluraan inhalatie anesthesie) wordt het dier in het toestel gepositioneerd. Micro PET/CT beeldvorming op zich veroorzaakt gering ongerief. Van het overgrote aantal dieren zal er maar eenmalig beeldvorming gedaan worden. Echter van een kleine groep dieren zullen 5 scans gemaakt worden (zie timeline observationele doelstelling). Dit veroorzaakt aangegeven ongerief.

Toedienen immunotherapie (matig/ernstig = 04): alle doelstellingen. Eenmalig voor doelstelling I, 3x voor doelstelling T1, T2, T3. Immunotherapie (zoutoplossing, L19, IL2 of L19-IL2) wordt intraveneus toegediend via de staartvene. Omdat de toediening drie keer plaatsvindt (dag 1, 3 en 5) wordt hieraan een ongerief score ernstig toegekend.

Bestraling (matig/ernstig = 04): Doelstelling T2, T3 en T4; eenmalig.

Het is noodzakelijk om de dieren onder verdoving (injectie anesthesie) te brengen gedurende de bestraling. Gezien de exacte lokalisatie (thv de tumor) van het bestralingsveld en de dosis (10 Gy) zullen de dieren geen systemische hinder ondervinden van de bestraling. Een huidreactie ter hoogte van de tumor kan geïnduceerd worden, maar zal naar verwachting beperkt blijven. We verhogen het ongerief naar ernstig = 05 voor de groepen die gecombineerde behandeling krijgen met immunotherapie.

Toedienen ipilimumab (matig = 03): Doelstelling T2x; 1x.

Ipilimumab (10 mg/kg) zal eenmalig i.v. geïnjecteerd worden.

GMC-SF toediening/injecties (matig/ernstig = 04): Doelstelling T2x; 7x

GMC-SF (8 µg/kg) zal dagelijks I.P. geïnjecteerd worden voor 7 dagen lang.

Rapamycine toediening (matig/ernstig = 04): Doelstelling T3, 7x

Dagelijks (7x) i.p. injectie 75µg/kg rapamycine.

Injectie pimonidazole/BrdU (matig = 03): alle doelstellingen; eenmalig.

Een uur voor het euthanaseren van de dieren wordt door middel van een i.p. injectie pimonidazole (60 mg/kg) en BrdU (30 mg/kg) toegediend. Voor doelstelling O gebeurt dit onder anesthesie (toegediend voor de beeldvorming) en is het ongerief gering.

Injectie Hoechst (matig = 03): alle doelstellingen; eenmalig.

1 minuut voor euthanaseren, wanneer het dier nog onder algehele anesthesie is, wordt door middel van een i.v. injectie Hoechst 33342 (15 mg/kg) toegediend. Voor doelstelling O2 gebeurt dit onder anesthesie en is het ongerief gering.

Doden van de muis en verwijderen van de tumor: (gering = 01) alle doelstellingen, eenmalig

Op het einde van het experiment wordt het dier onder sedatie ge-euthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. Onmiddellijk hierna worden de tumor en relevante organen verwijderd. Aangezien het verwijderen post mortem gebeurt is er geen sprake van ongerief.

10b. Welzijnsevaluatie

Een welzijnsevaluatie (ongerieflogboek) wordt bijgehouden en wordt in geval van de groei curve experimenten vergeleken met vorige resultaten.

11. Verzorging en huisvesting

Zowel de diervverzorgers van het CPV als de onderzoekers verzorgen de dieren. Op deze wijze is het toezicht op en het welzijn van de dieren gewaarborgd.

129/Sv-Hsd en Balb/c muizen worden gehuisvest in standaard kooien op experimentele afdeling, in groepen van max 3 muizen. NMRI-nu nu/nu, Balb/c nu/nu en RAG2-KO muizen worden gehuisvest in filtertop/IVC kooien op _____ in groepen van max 3 muizen. Water en voedsel worden verstrekt ad libitum. Kooien worden volgens de standaardregels onderhouden. Kooiverrijking dient voorzien te worden. In het geval van calamiteiten contact opnemen met VO (_____ of VVO _____.

12. Deskundigheid

De experimenten zullen worden uitgevoerd door een art. 9 en een art. 12 in het onderzoek beide met meer dan 5 jaar ervaring. Daarnaast zal een PhD student (art. 9) meehelpen bij de uitvoering.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

Implantatie van tumoren:

Voorafgaand aan de experimenten worden, nadat de dieren gedurende een week in quarantaine op het CPV zijn geweest, de tumoren subcutaan geïmplantéerd. De cellijnen zullen ter beschikking gesteld worden aan de bevoegde instanties in verband met microbiologische screening. Hiertoe worden de dieren gefixeerd en vervolgens wordt 3×10^6 F9, 10^6 C51 of 10^5 67NR cellen ingespoten in de flank van de muis. De gemaakte incisie wordt na het voorzichtig terugtrekken van de naald gedurende een korte periode manueel dichtgehouden. Daarna kan de laesie op spontane wijze genezen. Wanneer de tumoren voelbaar aanwezig zijn, worden de tumoren opgemeten met een Vernier calliper.

PET/CT beeldvorming:

Muizen worden intraveneus via de staartvene (na fixatie in een staartfixator) geïnjecteerd met $1 \mu\text{g/kg}$ $3.7 \text{ MBq } ^{124}\text{I-L19}$ (Tijink et al. 2009). Twee dagen voor de start van het experiment wordt 0.1% kaliumjodide aan het drinkwater toegevoegd om opname van radioactief jodium in de schildklier te voorkomen. Het proefdier wordt onder anesthesie gebracht met isofluraan (onderhoud: 1.5-2.0%). Het anestheticum wordt toegediend via een mondkapje met behulp van een combinatie van perslucht als dragergas. De diepte van de anesthesie wordt gecontroleerd via testen van de ooglid- en teenreflex. Het proefdier wordt gepositioneerd in de PET/CT camera. Er wordt een micro PET/CT gebruikt aangezien deze speciaal ontwikkeld is voor beeldvorming van kleine proefdieren. Beeldvorming wordt uitgevoerd op tijdstippen 3, 6, 24, 48, 72 uur na injectie zoals hoger beschreven. Gedurende het experiment wordt de lichaamstemperatuur op peil gehouden door middel van een warmteplaat. Tijdens de narcose wordt er oogzalf aangebracht om uitdroging van de ogen te vermijden. Na de beeldvorming kan het proefdier terug wakker worden in een voorverwarmde kooi.

Immunotherapie:

Op dag 1, 3 en 5 worden muizen intraveneus via de staartvene (na fixatie in een staartfixator) geïnjecteerd met 0.8 mg/kg fusion protein L19-IL2 of een vergelijkbare hoeveelheid L19 (0.53 mg/kg), IL2 (0.27 mg/kg) of zoutoplossing.

Bestraling:

De proefdieren worden in een afgesloten kooi vervoerd naar _____. Daar worden ze onder algehele verdoving gebracht met een intraperitoneale combinatie injectie van $100 \text{ mg/kg} + 10 \text{ mg/kg}$ ketamine/xylazine mix (= 1 injectie) 10 minuten voor bestraling. Tijdens de narcose wordt er oogzalf aangebracht om uitdroging van de ogen te vermijden. Bestraling gebeurt in een muis aangepaste module waarbij enkel de tumor in het stralingsveld liggen (rest van de muis wordt afgedekt met een loodafscherming van 2 cm dikte). Vervolgens zal de tumor met een gamma straling, 225 KV, met een tevoren bepaalde dosis (10 Gy) op een tevoren berekend plan bestraald worden. De gehele procedure zal ongeveer 10 minuten in beslag nemen.

Ipilimumab injecties:

Muizen worden eenmalig intraveneus via de staartvene (na fixatie in een staartfixator) geïnjecteerd met 10 mg/kg ipilimumab.

GMC-SF injecties:

Muizen worden I.P. geïnjecteerd met 8 µg/kg GMC-SF voor 7 opeenvolgende dagen. De GMC-SF injecties worden zo gepland dat de bestraling plaatsvindt op dag 4 van de GMC-SF behandeling

Rapamycine injecties:

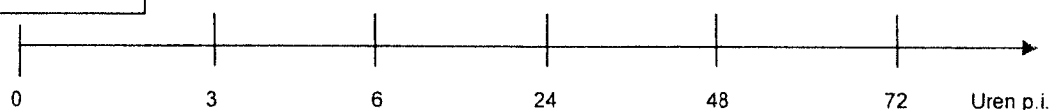
Muizen worden I.P. geïnjecteerd met 75µg/kg rapamycine, voor 7 opeenvolgende dagen na de radiotherapie behandeling.

Relevante literatuur

- Araki K. Turner A.P. Olivia Shaffer V. et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation Nature 2009; 460
- Borsi L. Balza E. Bestagno M. et al. Selective Targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin International Journal of Cancer 2002; 102, 75–85.
- Borsi L., Balza E., Carnemolla B. et al. 2003, Selective targeted delivery of TNFα to tumor blood vessels, BLOOD 2003 102 (13).
- Carnemolla B. Borsi L. Balza E. et al. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix Blood 2002; 99 (5).
- Cameron R.B. Spiess P.J. Rosenberg S.A. Synergistic antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes, interleukin 2, and local tumor irradiation The journal of experimental medicine 1990; 171
- Damaria S. Ng B, Devitt L. et al. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 2004 58(3): 862-870.
- Demaria S. Bhardwaj N. McBride W.H. et al. Combining radiotherapy and immunotherapy: a revived partnership. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005 63(3): 655–666
- Formenti S.C. Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy Lancet Oncology 2009; 10(7)
- Halin C. Rondin S. Nilsson F. et al. Enhancement of the antitumor activity of interleukin-12 by targeted delivery to neovasculature, Nature Biotechnology 2002; 20.
- Matsumura S. Wang B. Kawashima N. et al. Radiation-Induced CXCL16 Release by Breast Cancer Cells Attracts Effector T Cells The Journal of Immunology, 2008, 181: 3099–3107
- Tijink B.M. Perk L.R. Budde M. ¹²⁴I-L19-SIP for immuno-PET imaging of tumour vasculature and guidance of ¹³¹I-L19-SIP radioimmunotherapy. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2009; 36: 1235-1244
- Wagner K. Schulz P. Scholz A. et al. The Targeted Immunocytokine L19-IL2 Efficiently Inhibits the Growth of Orthotopic Pancreatic Cancer. Clinical Cancer Research 2008; 14(15)

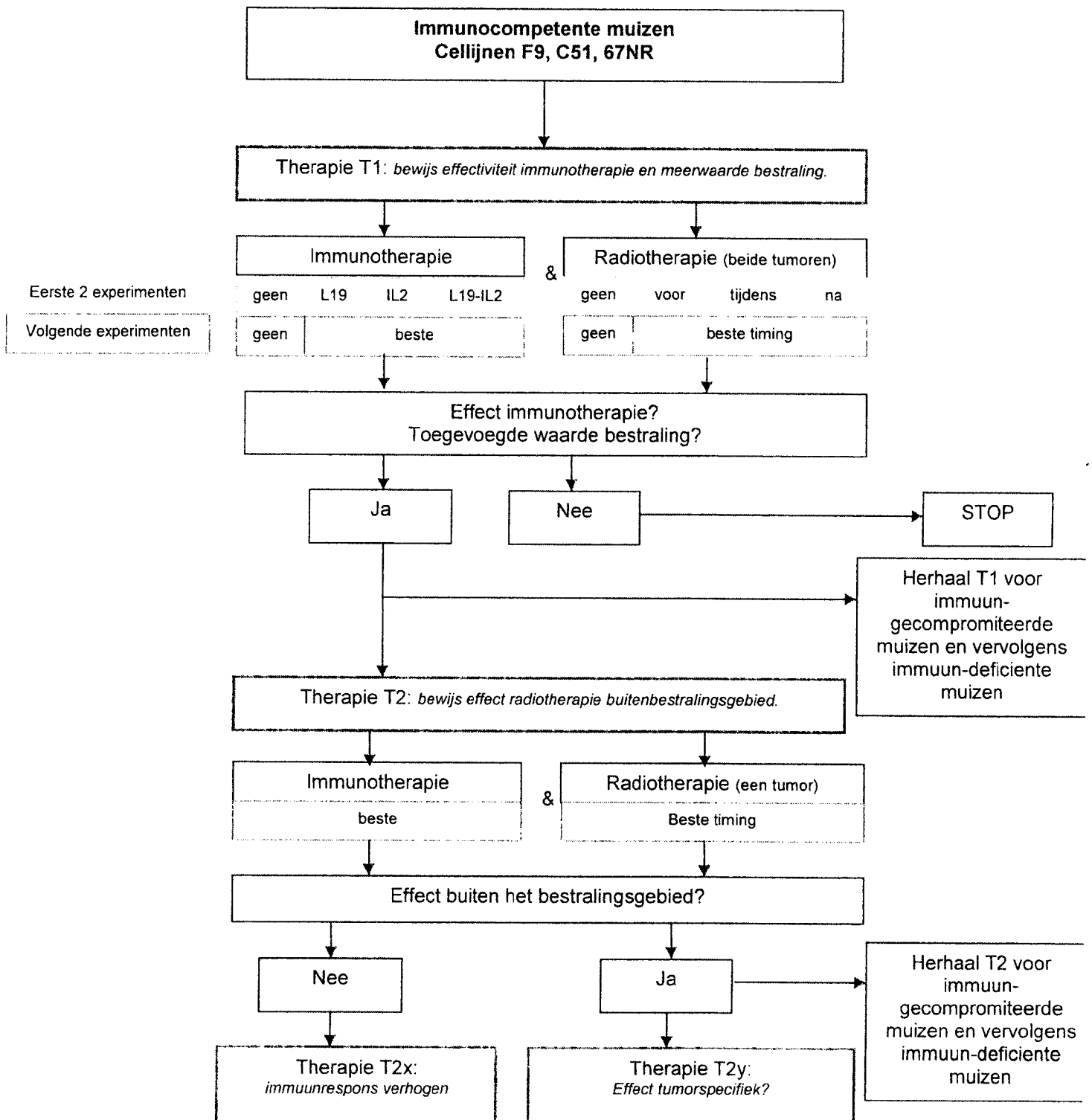
Tijdslijn Observationele doelstelling

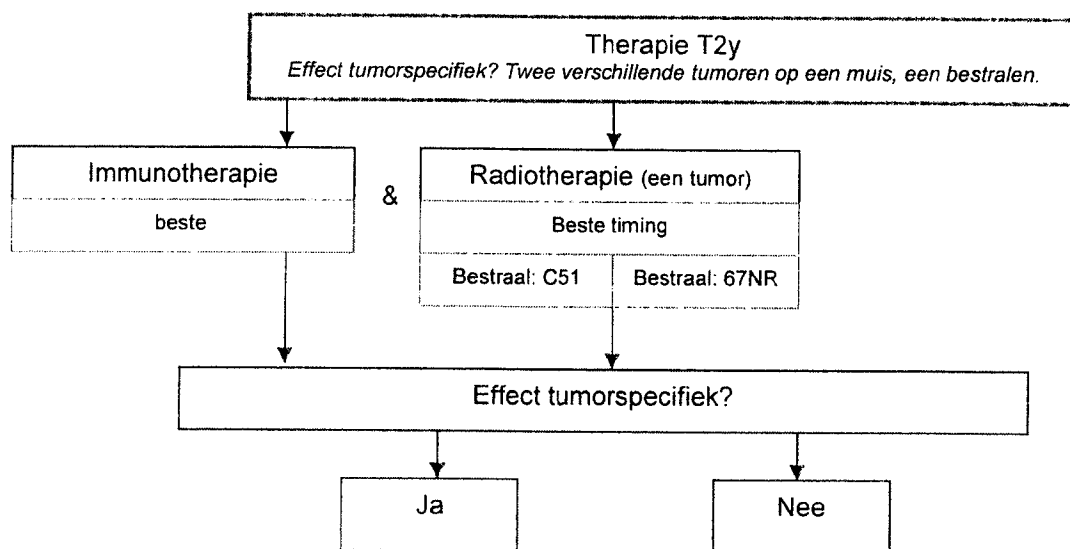
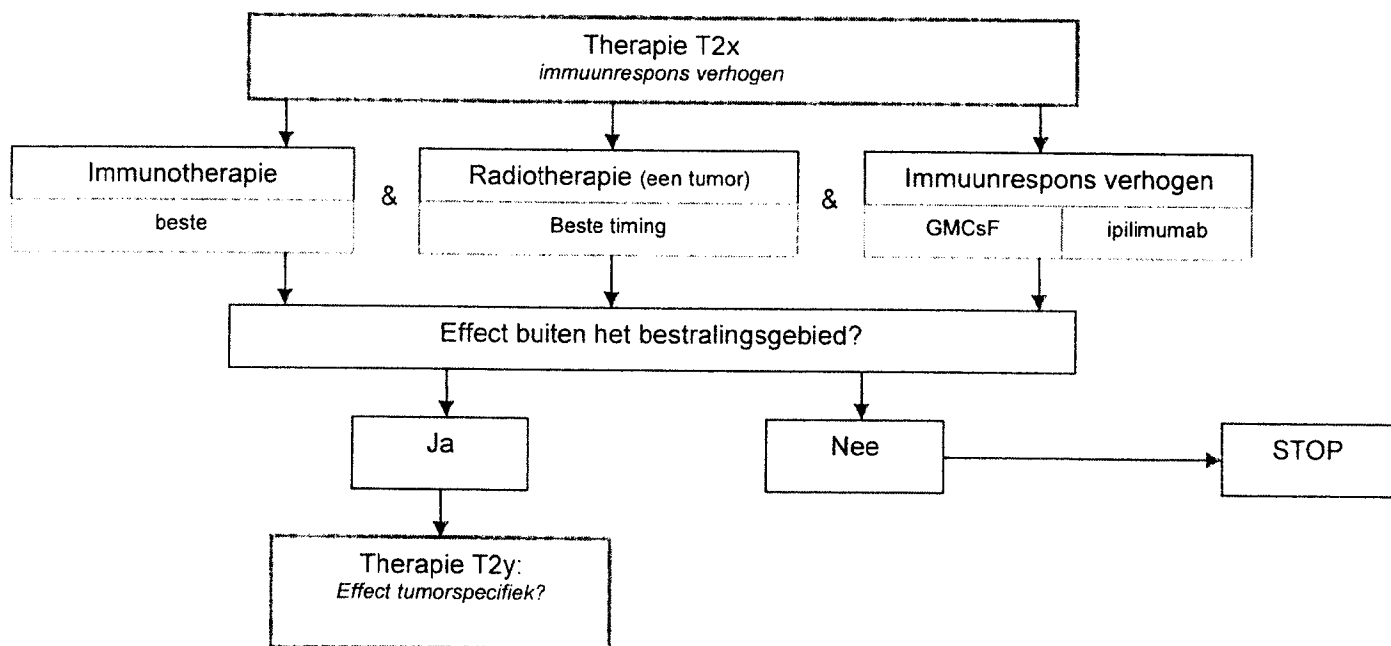
Tumor $\pm 250 \text{ mm}^3$
 Injectie ^{124}I -L19 of ^{124}I -
 controle antilichaam

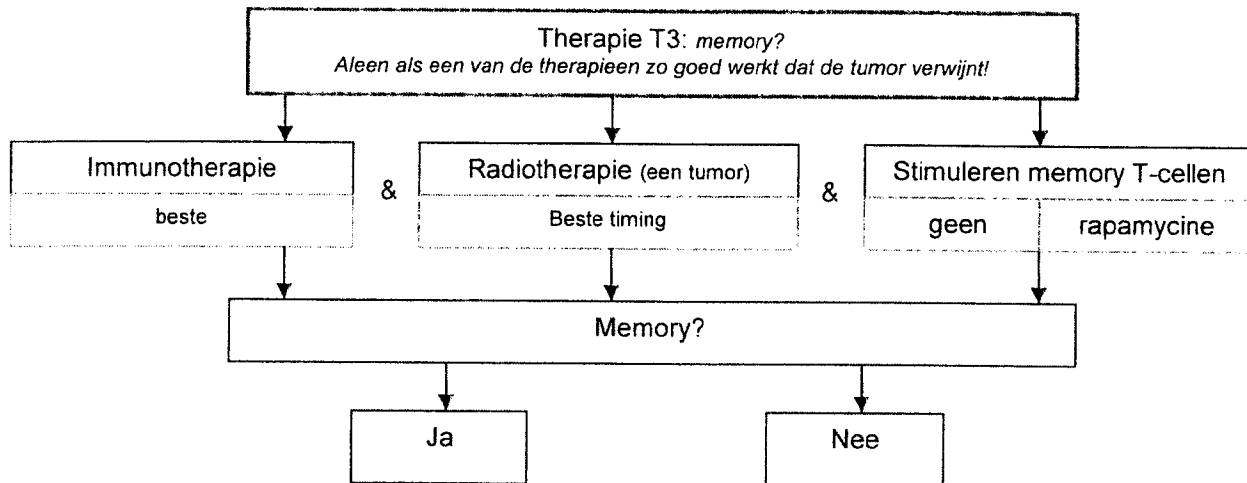


Uren p.i.	3	6	24	48	72
6 muizen 3 -> L19 3 -> controle	PET + Biodistributie †				
6 muizen 3 -> L19 3 -> controle		PET + Biodistributie †			
6 muizen 3 -> L19 3 -> controle			PET + Biodistributie †		
6 muizen 3 -> L19 3 -> controle				PET + Biodistributie †	
6 muizen 3 -> L19 3 -> controle	PET	PET	PET	PET	PET + Biodistributie †
Totaal aantal muizen per cellijn: 30					

Flowchart Therapie doelstellingen









University Maastricht

Faculty of Health, Medicine
and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

p/a Secretariaat DEC-UM
Postbus 616
NL-6200 MD Maastricht
Telefoon: :

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 29-03-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*Can radiotherapy enhance the immunotherapy effect of L19-IL2?*", is op de DEC vergadering van 25 maart 2011 besproken.

De DEC heeft een aantal vragen en opmerkingen:

- De DEC verzoekt bij punt 2 het woordje "zal" aan te passen in "kan" en bij punt 4 het woordje "enig" aan te passen in "mogelijk".
- De DEC realiseert zich dat dit zeer waardevol onderzoek is, maar gezien de grote hoeveelheid dieren die gevraagd worden en het hoge ongerief, verwacht de DEC een betere onderbouwing en uitwerking van de aantallen. De DEC vraagt zich af hoe de berekening van de aantallen is getransformeerd naar de tabel. Daarnaast dient te worden aangegeven waarom voor alle experimenten de drie tumoren gebruikt dienen te worden en niet voor een subset.
- Bij punt 7c- 01 en 02- is het voor de DEC niet helemaal duidelijk waar de 30% en 17% aan refereren en de DEC is van mening dat er geen powerberekening nodig is, omdat er geen verschillen tussen groepen getest worden. De DEC denkt dat 3 dieren met 2 tumoren voldoende zijn om tumorgroei en binding van L19 te bewijzen en hier is geen statistische onderbouwing voor vereist.
- De DEC verzoekt opnieuw naar de berekening van de aantallen te kijken, deze is niet juist. De uitvalberekening van T1 en T2 is niet juist.
- Bij punt 10a verzoekt de DEC aan te geven hoe vaak "herhaaldelijk ontwaken uit anesthesie" is. Bij het ongerief zijn een aantal handelingen (injecties) niet vermeld, gaarne toevoegen bij het ongerief en het totale ongerief aangeven. Voor alle handelingen de aard, ernst, duur, en de frequentie aangeven.
- De DEC merkt nog op dat de aanvraag erg onduidelijk en niet transparant is opgeschreven.

Conclusie:

Het project wordt aangehouden.

Gelieve eventuele vragen te beantwoorden in een brief en indien noodzakelijk Uw project **aan te passen en duidelijk de aanpassingen grijs te markeren.**

Uw project staat bij de DEC geregistreerd onder nummer **2011-042**, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

Voorzitter DEC-UM

Secretariaat CPV-UM

Maastricht, 15 April 2011

Betreft: project 2011-042 opmerkingen

Geachte voorzitter DEC,

Naar aanleiding van uw opmerkingen op de projectaanvraag 2011-042 "*Can radiotherapy enhance the immunotherapy effect of L19-IL2?*", wil ik volgende antwoorden formuleren.

- * De DEC verzoekt bij punt 2 het woordje "zal" aan te passen in "kan" en bij punt 4 het woordje "enig" aan te passen in "mogelijk".

De woorden "zal" en "enig" heb ik vervangen door "kan" en "mogelijk" in de herziene versie van het protocol.

- * De DEC realiseert zich dat dit zeer waardevol onderzoek is, maar gezien de grote hoeveelheid dieren die gevraagd worden en het hoge ongerief, verwacht de DEC een betere onderbouwing en uitwerking van de aantallen. De DEC vraagt zich af hoe de berekening van de aantallen is getransformeerd naar de tabel. Daarnaast dient te worden aangegeven waarom voor alle experimenten de drie tumoren gebruikt dienen te worden en niet voor een subset.

In de tekst is een verduidelijking aangebracht (grijs gemarkeerd) ten aanzien van de gevraagde aantallen muizen per doelstelling. Deze zijn terug te vinden terug in de tabellen. Daarnaast zijn er in de tabellen twee kolommen toegevoegd waarbij het totaal aantal muizen per observationele of therapeutische doelstelling gegroepeerd is per diergroep. Deze komen overeen met de aantallen op het voorblad.

Tijdens de experimenten maken we gebruik van drie verschillende tumorlijnen om het onderzoek kracht bij te zetten. Het gaat hier om een teratoom, een darm- en een borstkanker cellijn. Deze cellijnen zouden verschillend kunnen reageren op de specifieke behandelingen. Er is echter wel voor gekozen om in doelstelling T1 (combineren van immunotherapie met radiotherapie), na de eerste twee experimenten, alleen de beste combinatie immunotherapie radiotherapie toe te passen in de derde tumorlijn en de vervollexperimenten in immunogecompromiteerde muizen.

- * Bij punt 7c- 01 en 02- is het voor de DEC niet helemaal duidelijk waar de 30% en 17% aan refereren en de DEC is van mening dat er geen powerberekening nodig is, omdat er geen verschillen tussen groepen getest worden. De DEC denkt dat 3 dieren met 2 tumoren voldoende zijn om tumorgroei en binding van L19 te bewijzen en hier is geen statistische onderbouwing voor vereist.

Doelstelling O1 blijkt naar nader inzien overbodig en is verwijderd uit het protocol.

Ik ben van mening dat er wel een powerberekening noodzakelijk is voor de observationele doelstelling, er wordt namelijk een verschil aangetoond tussen de binding met L19 of de binding met een controle antilichaam. De uitleesparameter is toegevoegd.

- * De DEC verzoekt opnieuw naar de berekening van de aantallen te kijken, deze is niet juist. De uitvalberekening van T1 en T2 is niet juist.

U heeft gelijk, er was een fout gemaakt. Deze is hersteld en gemarkeerd.

- * Bij punt 10a verzoekt de DEC aan te geven hoe vaak "herhaaldelijk ontwaken uit anesthesie" is. Bij het ongerief zijn een aantal handelingen (injecties) niet vermeld, gaarne toevoegen bij het ongerief en het totale ongerief aangeven. Voor alle handelingen de aard, ernst, duur, en de frequentie aangeven.

Het herhaaldelijk ontwaken uit de anesthesie is alleen noodzakelijk voor een kleine groep dieren. Om dit te verduidelijken is een tijdslijn toegevoegd in de bijlage. De injectie met pimonidazole/BrdU en Hoechst ben ik inderdaad vergeten te vermelden bij het ongerief. Deze zijn toegevoegd.

- * De DEC merkt nog op dat de aanvraag erg onduidelijk en niet transparant is opgeschreven.

Om u inzicht te geven in de opbouw van het experiment heb ik een tijdslijn en een flowchart toegevoegd voor respectievelijk de observationele en therapeutische experimenten. Ik hoop dat deze u meer duidelijkheid geven.

Met vriendelijke groeten,

Aan:

*Ons kenmerk**Doorkiesnummer**Maastricht*
02-05-2011*Project: Can radiotherapy enhance the immunotherapy effect of L19-IL2?*DEC-UM
Voorzitter DEC-UM**Verantwoordelijk onderzoeker (VO):**

p/a secretariaat DEC-UM

Hierbij delen wij U mede dat voornoemd project aan de ethische
toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Secretariaat DEC-UM

De DEC maakt geen bezwaar tegen uitvoering van dit project zoals
aangevraagd en geeft een **positief advies**.

Bezoekadres**Projectnummer:** 2011-042*Postadres***Diersoort:** muis

Postbus 616

Aantal dieren: 651

6200 MD Maastricht

Einddatum: 29-04-2015

Uw project staat bij de DEC en CPV geregistreerd onder bovenstaand
nummer. Gelieve dieren, die voor dit project bestemd zijn, ook onder dit
nummer aan te vragen.

Voorzitter DEC-UM

Vice-Voorzitter DEC-UM