

Begeleidingsformulier aanvraag dierproef DEC- UM

Versie nov. 2005

DECNR: 2011-163**Ontvangen: 19-01-2012****Herziene versie**

DEC datum goedkeuring#	Type aanvraag 2
	Nieuw

VROM/GGONR ³

LNV/CBDNR ⁴

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

Deelproject							*****
-------------	--	--	--	--	--	--	-------

Financieel beheerder	*****
----------------------	-------

Budgetnummer	*****
--------------	-------

Titel van het onderzoek:

SPECT en PET imaging van angiogenese met behulp van nucleair gelabelde peptiden en peptidomimetics

 startdatum **Januari 2012** einddatum ⁹ **Januari 2016** Duur van de proef¹⁰: **6 weken**

	Naam	Tel (+ enkel VO, VVO en VM)	Tel privé	E-mailadres	Bevoegdheid ⁵	Cap. /afdeling	groep
1. Verantwoordelijk onderzoeker (VO)	*****	*****	*****	*****	Art. 9	*****	
2. Vervanger VO (VVO)	*****	*****	*****	*****	Art. 9	*****	
3. (VM) GGO ⁷	*****	*****	*****	*****		*****	
4. overige uitvoerenden	*****	*****	*****	*****	Art. 12	*****	
	*****	*****	*****	*****	Art. 12	*****	
5	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
6	*****	*****	*****	*****	Art. 9	*****	
7	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
8	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

Diergroep	1	2	3	4			
ctrl/exp/sham	Exp	Exp	Exp	Exp			
Diersoort	01	01	01	01			
Stam	BALB/c nu/nu	BALB/c nu/nu	BALB/c nu/nu	BALB/c nu/nu			
Construct / mutatie ?	-	-	-	-			
Herkomst (leverancier) *	02	02	02	02			
Aantal	150	25	200	50			
Geslacht	m/v	m/v	m/v	m/v			
Dieren immuuncompetent ?	nee	nee	nee	nee			
Leeftijd/gewicht	6-10 weken	6-10 weken	6-10 weken	6-10 weken			
Doel van de proef *	30	30	30	30			
Belang van de proef *	01	01	01	01			
Toxicologisch onderzoek *	01	01	01	01			
Bijzondere technieken *	01	01	01	01			
Anesthesie *	04	04	04	04			
Pijnbestrijding *	01	01	01	01			
Mate ongerief *	03	03	03	03			
Toestand dier einde exp*	01	01	01	01			

* VHL-coderingen zie bijlage

Aanvraag dierproef DEC-UM

Titel: SPECT en PET imaging van angiogenese met behulp van nucleair gelabelde peptiden en peptidomimetics

1. Doel van de proef

Om de juiste behandelingsmethode voor kanker te bepalen, is het van groot belang om een goede diagnose te kunnen stellen. Diagnoses worden gesteld met behulp van CT, PET, SPECT en MRI scans. Duidelijke visualisatie van tumoren is echter niet altijd mogelijk, doordat het contrast tussen de tumor en het omliggende weefsel te laag is. Het gebruik van tracers die specifiek binden aan tumoren zal de zichtbaarheid aanzienlijk verhogen en zodoende een preciezere diagnose opleveren. Door betere diagnostiek is het mogelijk tumoren in een vroeger stadium te ontdekken en te behandelen. Daarnaast kan het succes van verschillende behandelmethoden beter worden geëvalueerd.

Het doel van dit onderzoek is de ontwikkeling van een nucleair gelabelde tracer voor imaging van kanker met behulp van SPECT en PET. De gelabelde tracers zijn gebaseerd op het synthetische peptide Anginex; Anginex-¹¹¹In, Anginex-¹⁸F en Peptidomimetic-¹⁸F. Dit peptide bindt aan het membraan-gebonden eiwit galactine-1 die specifiek tot expressie komt tijdens angiogenese, de vorming van nieuwe bloedvaten, bij tumoren. In deze studie wordt de binding aan twee humane tumormodellen, LS174T (geen expressie galectine-1) en MDA-MB-231 (wel expressie galectine-1) onderzocht.

In deze studie zal Anginex vergeleken worden met de negatieve controle β pep-28; β pep-28-¹¹¹In voor Anginex-¹¹¹In en β pep-28-¹⁸F voor Anginex-¹⁸F. Bij dit peptide is het gedeelte dat verantwoordelijk is voor binding aan galectine-1, vervangen zodat deze niet meer bindt.

Allereerst zullen de verschillende tracers getest worden op hun geschiktheid voor targeting:

- 1) Bepaling van de optimale dosering van de nieuwe tracers.
- 2) Bepaling van de bloedkinetiek en secretie van de nieuwe tracers.

Vervolgens zal de in deze twee experimenten gevonden optimale dosering van de tracers en de bloedkinetiek data worden gebruikt om met behulp van biodistributies de reeks probes met optimale parameters te testen op hun geschiktheid voor targeting:

- 3) Bepaling van targeting kwaliteiten van de vijf tracers, waarbij goed wordt gekeken naar de verschillen tussen de (positieve) tracers en negatieve controles.

Tenslotte zullen de probes worden gebruikt in uitgebreide imaging experimenten:

- 4) Imaging experimenten met de juiste dosis, injectietijd en circulatietijd van de probes, voor het verkrijgen van de optimale tumor targeting en visualisatie van de tumoren.

Uitleesparameters:

- De radioactiviteit wordt gemeten in bloed, urine en organen om de bloedkinetiek en biodistributie van tracers te bepalen.
- Imaging met SPECT en PET om te tracers als imaging probes te karakteriseren.

2. Maatschappelijke relevantie en/of wetenschappelijk belang



Volgens de Wereldgezondheidsorganisatie WHO is kanker wereldwijd een van de belangrijkste doodsoorzaken. In 2010 zijn in Nederland ruim 42 duizend mensen overleden door kanker. De ziekte is daarmee verantwoordelijk voor bijna een derde van de totale sterfte. Door bevolkingsgroei en vergrijzing neemt het aantal sterfgevallen door kanker al decennia geleidelijk toe.

In 2030 verwacht de WHO dat wereldwijd tussen de 20 en 26 miljoen mensen zullen worden gediagnosticeerd met kanker, waarvan tussen de 13 en 17 miljoen mensen aan de ziekte zullen

sterven. De verbetering van diagnostiek en therapie van deze ziekte is daarom van groot belang.

3. Alternatieven

Voor het gebruik van nieuwe specifieke contrastmiddelen voor kanker is het van belang om na te gaan of de tracer het contrast van de tumor dusdanig verhoogd dat het leidt tot een betere diagnose. Daarbij moet worden onderzocht hoe een tracer zich distribueert in een lichaam en hoe lang de tracer circuleert in het bloed en of deze specifiek wordt opgenomen in de tumor. Omdat dit vanuit medisch en ethische overwegingen niet direct in patiënten getest kan worden, komt alleen een diermodel in aanmerking.

4. Ethische afweging

Het patient-belang om onderzoek te doen naar de behandeling van kanker is groot. Door de vergrijzing zullen de sterftegevallen alleen maar toenemen. Hoewel voor bepaalde vormen van kanker de behandeling een hoge kans van slagen heeft, zijn andere vormen van kanker nog steeds niet goed te behandelen. Omdat dit nieuw ontwikkelde tracers zijn, is het gebruik van diermodellen noodzakelijk. Gezien het hoge aantal patiënten dat gebaat is bij onderzoek naar effectievere behandelmethoden van kanker, weegt onzes inziens de maatschappelijke relevantie op tegen het ongerief van de muis.

5. Wetenschappelijke onderbouwing

Antikankertherapie gericht op angiogenese is een relatief nieuwe methode voor de behandeling van tumoren. Angiogenese is de vorming van nieuwe bloedvaten. Tumoren zijn voor hun groei afhankelijk van dit proces voor de aanvoer van zuurstof en voedingsstoffen. Tumorcellen zijn in staat de vorming van nieuwe bloedvaten te stimuleren door productie van angiogene factoren. Therapieën tegen angiogenese hebben een grotere kans van slagen dan medicijnen gericht tegen de tumoren zelf, omdat in het verleden is gebleken dat tumoren dusdanig kunnen muteren dat zij resistent worden tegen bijvoorbeeld cytostatica. De endotheelcellen die angiogenese ondergaan maken geen deel uit van de tumor. Deze cellen zijn daardoor minder gevoelig voor mutaties, waardoor eiwitten die zijn betrokken bij dit proces geschikte targets zijn voor therapie.

Nieuw gevormde bloedvaten tijdens angiogenese zijn te onderscheiden van al bestaande bloedvaten door de overexpressie van specifieke angiogene factoren, bijvoorbeeld galectine-1. Onderzoek heeft aangetoond dat het gesynthetiseerde 33-mer peptide Anginex bindt aan dit eiwit en zodoende in staat is angiogenese te remmen³. Anginex is daarom een uiterst geschikt molecuul voor zowel anti-kanker therapie, als tracer voor imaging technieken.

De tracers die worden beschreven in deze DEC-aanvraag zijn ontworpen voor SPECT (Anginex-¹¹¹In) en PET (Anginex-¹⁸F) imaging. Nucleaire imaging technieken, al dan niet in combinatie met CT, zijn zeer geschikte methodes voor de diagnose van tumoren met behulp van tracers. Het zijn namelijk zeer gevoelige technieken (10^{-10} - 10^{-11} mol/L), wat betekent dat slechts zeer kleine hoeveelheden van de tracers gebruikt hoeft te worden. Er zijn daarom geen problemen te verwachten over de toxiciteit van de tracers. In combinatie met CT is het mogelijk om een juiste diagnose te stellen met betrekking tot de plaats van de tumor in een lichaam.

De controles (β pep-28-¹¹¹In voor SPECT imaging, β pep-28-¹⁸F voor PET imaging) die in deze studie gebruikt zullen worden zijn gebaseerd op Anginex⁴, maar verschillen in hun functionele domein. De aminozuren die resulteren in binding van Anginex aan galectine-1, zijn bij β pep-28 vervangen door andere aminozuren. Hierdoor zal dit peptide niet binden aan galectine-1 en is deze als negatieve controle te gebruiken. In diersystemen is dit molecuul nog niet eerder gevalideerd als negatieve controle.

De laatste tracer die in deze DEC-aanvraag beschreven wordt (Peptidomimetic-¹⁸F) is niet direct afkomstig van het peptide Anginex, maar een derivaat van compound 0118, een klein chemisch molecuul gebaseerd op de 3D-structuur van Anginex⁵. Eerdere studies hebben aangetoond dat de anti-angiogene werking van compound 0118 van dezelfde orde grootte is als die van Anginex, en dit peptidomimetic wordt tegenwoordig al getest in klinische studies. Kleine chemische drug moleculen hebben vaak een betere PK/PD profiel dan peptides, waardoor de ¹⁸F-gelabelde compound 0118 analoog een zeer interessante tracer kan zijn (ook met het oog op mogelijke toepassing als 'companion diagnostic').

In deze studie wordt de binding aan twee humane tumormodellen onderzocht: het darmkanker model LS174T en het borstkanker model MDA-MB-231-LITG. De eerstgenoemde tumorlijn brengt geen galectine-1 tot expressie, waardoor deze cellijn een goede controle is voor galectine-1 targeting. De laatstgenoemde tumorlijn brengt wel galectine-1 tot expressie en is in een eerdere studie (.....) gebruikt voor reporter gen imaging met SPECT en geeft een stabiele expressie van HSV1-TK (Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase), fluc (vuurvlieggluciferase) en GFP (green fluorescent protein). Door de verschillen in galectine-1 expressieniveaus van deze twee cellijnen kunnen we aantonen of Anginex alleen aan de endotheelcellen bindt of dat deze ook tot buiten het vaatsysteem diffundeert en aan tumorcellen bindt.

Als deze imaging strategieën voor SPECT en PET op basis van Anginex succesvol blijkt te zijn, is het peptide in de toekomst ook een goede kandidaat voor de ontwikkeling van radiotherapie tegen kanker.

6. Wetenschappelijke beoordeling

..... Dit protocol is wetenschappelijk beoordeeld en goedgekeurd door de principal investigators.

7. Proefdier keuze

7a Soort, stam: BALB/c nu/nu muizen.

herkomst: leverancier met geregistreerde fok/afleververgunning

eindbestemming: gedood in de proef/gedood na de proef

7b Sexe:

De experimenten kunnen worden uitgevoerd met zowel mannelijke als vrouwelijke muizen.

7c Aantallen: $150 + 25 + 200 + 50 = 425$ muizen

De tracers $\beta\text{pep-28-}^{111}\text{In}$, $\beta\text{pep-28-}^{18}\text{F}$ zullen vervangen worden door Anginex2- ^{18}F en Peptidomimetic2- ^{18}F .

Experiment 1: Dosering

In dit experiment zal worden gekeken naar dosering. Het vinden van de optimale dosering is van belang om zoveel mogelijk opname in de tumor te krijgen. Op basis van de resultaten van deze proef wordt de optimale dosering bepaald die gebruikt zal gaan worden in de verdere experimenten. Ook zal op basis van dit experiment besloten worden of het nodig is met beide tumormodellen (MDA-MB-231-LITG en LS174T) in experiment 3 verder te gaan, of dat 1 model volstaat. Er zullen verschillende concentraties van de tracers worden geïnjecteerd. Op verschillende tijdstippen zal er bloed worden afgenomen om de hoeveelheid tracer in het bloed te bepalen. Vervolgens zullen de muizen op verschillende tijdstippen opgeofferd worden om de biodistributie te bepalen. Voordat de biodistributie plaatsvindt, kunnen de muizen eerst met een gemeten worden. Verwacht wordt dat er 15 muizen (2 á 3 dieren per groep * 3 doses * 2 tijdstippen) nodig zijn om de optimale dosis en tijdstip te vinden per tracer.

In totaal worden er 5 tracers getest; Anginex- ^{111}In , Anginex- ^{18}F , $\beta\text{pep-28-}^{111}\text{In}$, $\beta\text{pep-28-}^{18}\text{F}$ en Peptidomimetic- ^{18}F . Aangezien het proces van tumorgroei en opname per model verschillend zal plaatsvinden, zal voor ieder tumormodel de optimale dosis en tijdstip van tracer injectie bepaald moeten worden.

Aantal benodigd per groep: 15 muizen

Benodigd aantal: 15 muizen x 5 tracers x 2 tumormodellen = 150 muizen

Totaal aantal benodigd voor experiment 1: 150 muizen

Experiment 2: Bloedkinetiek

In deze studie zal gekeken worden naar de bloedkinetiek en de secretie van de vijf tracers (Anginex- ^{111}In , Anginex- ^{18}F , $\beta\text{pep-28-}^{111}\text{In}$, $\beta\text{pep-28-}^{18}\text{F}$ en Peptidomimetic- ^{18}F) in muizen zonder tumor. Op basis van de resultaten van deze proef worden 3 tijdstippen gekozen voor de biodistributieproef (experiment 3). Er zal op maximaal 6 verschillende tijdstippen bloed worden afgenomen, om zo de verschillende tracers met elkaar te kunnen vergelijken. Voor het bepalen van de groepsgrootte hebben we de sample size calculation tool van de VanDerBilt University gebruikt (www.mc.vanderbilt.edu/prevmed/ps). Eerdere experimenten (DEC 2009-082 en 2010-100) leverden een standaarddeviatie (σ) van ongeveer 15% op. We willen een verschil tussen de groepen kunnen zien van ongeveer 35%. Als we een power van 80% aanhouden en een onbetrouwbaarheid van de toets van $\alpha = 0.05$, levert dit 4 dieren per groep op. De uitval vanwege injectie van de tracer wordt geschat op 10%.

Aantal benodigd per groep: 4 muizen

$(a - 0,1a) = 4,44$ $a = 5$

Benodigd aantal: 5 muizen x 5 tracers = 25 muizen

Totaal aantal benodigd voor experiment 2: 25 muizen

Experiment 3: Biodistributie

Aan de hand van de resultaten van experiment 1 en 2 wordt besloten is of er met 1 of 2 tumormodellen verder wordt gegaan in experiment 3 (3 opties):

- 1) Beide tumormodellen laten vergelijkbare tumoropname zien (%injected dose/g tumor: verschil is kleiner dan 25%):
gebruik van 1 tumormodel in experiment 3
 $(5 \times 5 \times 1 \times 3 + 5 \times 5 \times 1 = 75 + 25 = 100)$
- 2) Eén tumormodel laat tumoropname zien, andere tumormodel laat geen tumoropname zien (tumoropname: ratio %injected dose/g in tumor/bloed is groter dan 3; geen tumoropname: ratio %injected dose/g in tumor/bloed is kleiner dan 3):
gebruik van beide tumormodellen, maar niet de combinatie van het tweede tumormodel en controle tracers in experiment 3
 $(5 \times 3 \times 2 \times 3 + 5 \times 2 \times 1 \times 3 + 5 \times 3 \times 2 + 5 \times 2 \times 1 = 90 + 30 + 30 + 10 = 160)$
- 3) Beide tumormodellen laten tumoropname zien, maar opname is beduidend anders (galectine-1 specifiek effect)
(%injected dose/g tumor: verschil is groter dan 25%):
Gebruik van beide tumormodellen en de controle tracers in beide modellen in experiment 3
 $(5 \times 5 \times 2 \times 3 + 5 \times 5 \times 2 = 150 + 50 = 200)$

Wanneer beide tumormodellen geen tumoropname laten zien (ratio %ID/g in tumor/bloed is kleiner dan 3), dan wordt niet verder gegaan met de studie.

In deze studie zal worden onderzocht hoe de verschillende tracers (Anginex-¹¹¹In, Anginex-¹⁸F, β pep-28-¹¹¹In, β pep-28-¹⁸F en Peptidomimetic-¹⁸F) zich over het lichaam verdelen voor beide tumormodellen. Het is van belang te weten of de (positieve) tracers een duidelijk verschil in contrast teweeg brengen tussen de tumor en de omliggende weefsels. Daarbij is het ook essentieel om te onderzoeken waar de tracers accumuleren als de radioactieve tracer gemengd wordt met een overmaat aan niet-radioactief peptide (blokkeringsexperiment).

Afhankelijk van de resultaten van de bloedkinetiek studie zullen voor iedere tracer de 3 beste tijdstippen worden gekozen voor het onderzoek naar biodistributie. Voordat de biodistributie plaatsvindt, kunnen de muizen eerst met een optische scanner gemeten worden. Voor het bepalen van de groeps groottes hebben we de sample size calculation tool van de VanDerBilt University gebruikt (www.mc.vanderbilt.edu/prevmed/ps). Eerdere experimenten (DEC 2009-082 en 2010-100) leverden een standaarddeviatie (σ) van ongeveer 20% op (tumordragende dieren). We willen een verschil tussen de groepen kunnen zien van ongeveer 45%. Als we een power van 80% aanhouden en een onbetrouwbaarheid van de toets van $\alpha = 0.05$, levert dit 4 dieren per groep op. De blokkeringsexperimenten zullen worden uitgevoerd op 1 tijdstip, gekozen aan de hand van de biodistributie studie. De uitval vanwege tumorgroei en injectie van de tracer wordt geschat op 20%.

Rekensom als beide tumormodellen worden gebruikt (optie 3, grootste aantal dieren):

Aantal benodigd per groep: 4 muizen

$$(a - 0,2a) = 4 \quad a = 5$$

Benodigd aantal: 5 muizen x 5 tracers x 2 tumormodellen x 3 tijdstippen = 150 muizen

Blokkeringsexperiment:

Aantal benodigd per groep: 4 muizen

$$(a - 0,2a) = 4 \quad a = 5$$

Benodigd aantal: 5 muizen x 5 tracers met blok x 2 tumormodellen = 50 muizen

Totaal aantal benodigd: $150 + 50 = 200$

Experiment 4: Imaging

In dit experiment zullen de muizen worden gescand voor de visualisatie van de tumor met SPECT en PET. In deze proef zullen de tracers Anginex- ^{111}In , Anginex- ^{18}F , $\beta\text{pep-28-}^{111}\text{In}$, $\beta\text{pep-28-}^{18}\text{F}$ en Peptidomimetic- ^{18}F worden onderzocht. Eerdere experimenten (DEC 2009-082 en 2010-100) leverden een standaarddeviatie (σ) van ongeveer 20% op (tumordragende dieren). Eveneens houden we een power van 80% aan en een onbetrouwbaarheid van de toets van $\alpha = 0.05$. Als we een verschil tussen de groepen willen zien van ongeveer 45%, levert dit 4 dieren per groep op. De tijdstippen hangen af van de uitkomsten van de bloedkinetiek en de biodistributie studie. Voordat de imaging scan plaatsvindt, kunnen de muizen eerst met een optische scanner gemeten worden. In dit experiment zal aan de hand van experimenten 1 t/m 3 besloten worden of de controle het tweede tumormodel of een blokkeringsexperiment zal zijn.

De uitval vanwege tumorgroei, injectie van de tracer, de anesthesie en de scan wordt wederom geschat op 20%.

Aantal benodigd per groep: 4 muizen

$$(a - 0,2a) = 4 \quad a = 5$$

Benodigd aantal: 5 muizen x 5 tracers = 25 muizen

Controle-experiment:

Aantal benodigd per groep: 4 muizen

$$(a - 0,2a) = 4 \quad a = 5$$

Benodigd aantal: 5 muizen x 5 tracers = 25 muizen

Totaal aantal benodigd: $25 + 25 = 50$

8. Experiment

De tracers β pep-28- ^{111}In , β pep-28- ^{18}F zullen vervangen worden door Anginex2- ^{18}F en Peptidomimetic2- ^{18}F .

Experiment 1: Dosering

Het vinden van de optimale dosering is van belang om zoveel mogelijk ophoping in de tumor en dus contrast te kunnen krijgen in de scans. De tracers zullen worden getest aan de hand van verschillende concentraties en op verschillende tijdstippen.

De muizen zullen op dag 0 worden geïnjecteerd met LS174T of MDA-MB-231-LITG tumorcellen s.c. in de flank/achterpoot. De groei van de tumor zal minstens twee keer in de week worden gemeten met behulp van een schuifmaat. Wanneer er geen tumorgroei zichtbaar is, kan er een tweede subcutane injectie met tumorcellen gegeven worden. Wanneer de tumor een grootte heeft van 50-300 mm³ zal het experiment verder worden uitgevoerd. De muizen zullen intraveneus of ip worden geïnjecteerd met de gelabelde tracer in de staartvene. Er zal op maximaal zes verschillende tijdstippen bloed via de vena saphena (maximaal 20 μL per keer) worden afgenomen om de hoeveelheid tracer in het bloed te bepalen (met behulp van radioactiviteit). Alternatief zal er één keer bloed worden afgenomen met een volume van maximaal 100 μL . Hierna zal op verschillende tijdstippen de biodistributie bepaald worden (maximaal 24 uur na injectie). Voordat de biodistributie plaatsvindt, kunnen de muizen eerst met een optische scanner gemeten worden (MDA-MB-231-LITG tumoren brengen GFP tot expressie).

Tijdslijn:

	1 – 6 weken		0 – 24 uur	max 1 uur	
T	M	I	B * 6	S	E

T: Injectie tumorcellen

M: Monitoren tumorgroei: minstens tweemaal per week

I: Injectie gelabelde tracer

B: Bloedafname (max. 6 keer; max. 20 μL per keer of max. 100 μL eenmalig)

S: Imaging scan (.....)

E: Hartpunctie, euthanasie en biodistributie

- - -: onder anesthesie

Experiment 2: Bloedkinetiek

Voordat het mogelijk is goede scans te maken met behulp van SPECT en PET is het van belang de secretiesnelheid van de gelabelde tracers te onderzoeken. Daarvoor is het noodzakelijk de bloedkinetiek van de verschillende probes te meten. Dit onderzoek zal informatie opleveren over de verschillen tussen de tracers. Dit zal gebeuren in muizen zonder tumor om invloed van de tumor op de bloedklaring uit te sluiten.

Voor dit experiment zullen 5 groepen worden gebruikt. De muizen worden geïnjecteerd met gelabelde tracer in de staartvene of ip. Er zal op maximaal 6 verschillende tijdstippen bloed worden afgenomen via de vena saphena (max. 20 μL per keer) om de mate van radioactiviteit te bepalen met behulp van een gamma-counter. Aan het eind van het experiment zullen de dieren onder anesthesie na een hartpunctie worden opgeofferd en zal de biodistributie van de probes worden bepaald.

Tijdslijn:

	0 - 24 uur	---
I	B * 6	E

I: Injectie gelabelde tracer

B: Bloedafname

E: Hartpunctie, euthanasie en biodistributie

---: onder anesthesie

Experiment 3: Biodistributie

In deze studie zullen per tumormodel 5 groepen worden gebruikt voor een biodistributie. Daarnaast zullen per tumormodel 5 groepen worden gebruikt voor een blokkeringsexperiment. De muizen zullen op dag 0 worden geïnjecteerd met LS174T of MDA-MB-231-LITG tumorcellen s.c. in de flank/achterpoot. De groei van de tumor zal minstens twee keer in de week worden gemeten met behulp van een schuifmaat. Wanneer de tumor een grootte heeft van 50-300 mm³ zal het experiment verder worden uitgevoerd. Voor de biodistributie zal gelabeld tracer (Anginex-¹¹¹In, Anginex-¹⁸F, β pep-28-¹¹¹In, β pep-28-¹⁸F of Peptidomimetic-¹⁸F) worden ingespoten in de staartvene of ip. Voordat de biodistributie plaatsvindt, kunnen de muizen eerst met een optische scanner gemeten worden. Afhankelijk van de resultaten van de bloedkinetiek studie, zullen de muizen op drie verschillende tijdstippen onder anesthesie na een hartpunctie worden geeuthanaseerd. De radioactiviteit van verschillende organen zullen in een gamma-counter worden gemeten.

Tijdslijn:

	1-6 weken		0 - 24 uur	max 1 uur	-----
T	M	I		S	E

T: Injectie tumorcellen

M: Monitoren tumorgroei: minstens tweemaal per week

I: Injectie gelabelde tracer

S: Imaging scans (.....)

E: Hartpunctie, euthanasie en biodistributie

---: onder anesthesie

Voor de blokkeringsexperimenten zal gelabeld tracer, vermengd met een overmaat van overeenkomstige niet-radioactief tracer, worden ingespoten in de staartvene. Op 1 tijdstip (afhankelijk van de resultaten van de biodistributie studie) zullen de muizen onder anesthesie na een hartpunctie worden geeuthanaseerd. Voordat de biodistributie plaatsvindt, kunnen de muizen eerst met een optische scanner gemeten worden. De radioactiviteit van verschillende organen zullen in een gamma-counter worden gemeten.

Tijdslijn:

	1-6 weken		0 - 24 uur	max 1 uur	-----
T	M	I		S	E

T: Injectie tumorcellen

M: Monitoren tumorgroei: minstens tweemaal per week

I: Injectie gelabelde en ongelabeld tracer

S: Imaging scans (.....)

E: Hartpunctie, euthanasie en biodistributie
- - -: onder anesthesie

Experiment 4: Imaging

In dit experiment zullen 5 groepen worden gebruikt. Voor het experiment kan beginnen zullen er wederom eerst de tumoren worden gegroeid tot een grootte van 50-300 mm³. Hierna zullen de muizen worden ingespoten met gelabeld tracer in de staartvene of ip (maximaal 24 uur voor de scan in een wakker dier, of vlak voor de scan onder anesthesie). De muizen worden daarna gescand in de SPECT of PET, gedurende maximaal 4 uur onder anesthesie. Aan het eind van de scan zullen de dieren na (indien nodig) een hartpunctie worden opgeofferd en zal de biodistributie van de probes worden bepaald.

Tijdslijn:

1-6 weken		0-24 uur		max. 4 uur	
T	M	I	of I	S	E

T: Injectie tumorcellen

M: Monitoren tumorgroei: minstens tweemaal per week

I: Injectie gelabelde tracer

S: Imaging scans (.....)

E: Hartpunctie, euthanasie en biodistributie

- - -: onder anesthesie

Voor de controle-experimenten zal worden gekeken aan de hand van experimenten 1 t/m 3 of dit gedaan kan worden met het tweede tumormodel of met een blokkeringsexperiment (gelabeld tracer wordt vermengd met een overmaat van overeenkomstige niet-radioactief peptide).

9. Experimentele condities

9a. Anesthesie

De muizen worden onder anesthesie gebracht door het toedienen van isofluraan (inductie 3-4%, onderhoud 1-2%) i.c.m. Medische Lucht 0,4 l/m als dragergas, in een inslaap-doos en vervolgens met mondkapje.

9b. Pijnbestrijding

Onder normale omstandigheden zal er geen pijnbestrijding worden toegepast. Indien de dieren echter tekenen van pijn vertonen zal in overleg pijnbestrijding (temgesic = buprenorfine) worden toegepast.

9c. Euthanasie en Humane eindpunten

- De dieren worden onder anesthesie geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie, in een O₂/CO₂ kamer of met een overdosis pentobarbital of isofluraan.
- Uitgangspunt voor de humane eindpunten is de code of practice voor kankeronderzoek (Inspectie W&V, 1999). Bij een gewichtsverlies van meer dan 15%, bij tumoren groter dan 1500 mm³, en bij andere macroscopische waarneembare afwijkingen, zoals bloedingen, open wonden, afwijkend neurologisch gedrag en infecties zal, na overleg met de artikel 12 en/of 14 functionaris, worden overgegaan tot voortijdige euthanasie van het dier. Daarnaast zal wanneer de dieren tijdens het experiment tekenen vertonen van pijn en/of ongerief, direct contact worden opgenomen met de artikel 12 en/of 14 functionaris om het beleid te bepalen. Het welzijn van het dier staat voorop.

10a. Ongerief

Het maximale ongerief voor het dier is weergegeven in onderstaande tabel:

Experiment 1 Dosering:

Procedure	Herhaling	Tijdsduur	Ongeriefcode
Inspuiten van tumorcellen sc met als gevolg tumorgroei	2	5 min	02
Het meten van de tumoren met een schuifmaat (2-3x per week, gedurende maximaal 6 weken)	max. 18	3 min	02
Ontwikkeling van de tumor (tot max. 300 mm ³)	1	Max. 6 wkn	02/03
Inspuiten iv met tracer via de staartvene (wakker)	1	10 min	02
Bloedafnames via vena saphena (max. 6x, verspreid over max. 24 uur)	6	3 min	03
..... onder anesthesie en aansluitend euthanasie	1	Max 1 uur	02
Totaal			03

Experiment 2 Bloedkinetiek:

Procedure	Herhaling	Tijdsduur	Ongeriefcode
Inspuiten iv met tracer via de staartvene	1	10 min	02
Bloedafnames via vena saphena (max. 6x, verspreid over max. 24 uur)	6	3 min	03
Hartpunctie/euthanaseren onder anesthesie	1		02
Totaal			03

Experiment 3 Biodistributie:

Procedure	Herhaling	Tijdsduur	Ongeriefcode
Inspuiten van tumorcellen sc met als gevolg tumorgroei	2	5 min	02
Het meten van de tumoren met een schuifmaat (2-3x per week, gedurende maximaal 6 weken)	max. 18	3 min	02
Ontwikkeling van de tumor (tot max. 300 mm ³)	1	Max. 6 wkn	02/03
Inspuiten iv met tracer via de staartvene (wakker)	1	10 min	02
Optical scans onder anesthesie en aansluitend euthanasie	1	Max 1 uur	02
Totaal			03

Experiment 4 Imaging:

Procedure	Herhaling	Tijdsduur	Ongeriefcode
Inspuiten van tumorcellen sc met als gevolg tumorgroei	2	5 min	02
Het meten van de tumoren met een schuifmaat (2-3x per week, gedurende maximaal 6 weken)	max. 18	3 min	02
Ontwikkeling van de tumor (tot max. 300 mm ³)	1	Max. 6 wkn	02/03
Inspuiten iv met tracer via de staartvene (wakker of onder anesthesie)	1	10 min	02
SPECT, PET, Optical scans onder anesthesie en aansluitend euthanasie	1	Max 4 uur	02

10b. Welzijnsevaluatie

Experimenten met BALB/c nu/nu muizen met MDA-MB-231-LITG en LS174T tumoren zijn eerder verricht. De handelingen zoals beschreven in punt 10a hebben bij deze modellen tot nu toe niet meer dan matig ongerief (03) veroorzaakt.

11. Verzorging en huisvesting

..... Aangezien de dieren niet immuuncompetent zijn, worden ze gehuisvest in geautoclaveerde bakken met filtertop, met geautoclaveerd water en bestraald voer. Verschonen gebeurt in een flow kast. De verzorging zal worden uitgevoerd door medewerkers van de Universiteit Maastricht volgens standaard richtlijnen. Bij eventuele calamiteiten zal de artikel 12/14 functionaris direct gewaarschuwd worden.

12. Deskundigheid

Ervaren artikel 12 functionarissen van de Universiteit Maastricht zullen het proefdierwerk uitvoeren. Zij zullen worden bijgestaan door de VO.

13. Standard Operation Procedures (SOP)

.....

Relevante literatuur

.....



University Maastricht

Faculty of Health, Medicine

and Life Sciences

Dierexperimenten Commissie

DEC

Aan:

voorzitter

p/a Secretariaat DEC-UM

Postbus 616

NL-6200 MD Maastricht

Telefoon

Uw referentie:

Onze referentie :

Maastricht, 19-12-2011

Geachte Onderzoeker,

Uw projectaanvraag: "*SPECT en PET imaging van angiogenese met behulp van nucleair gelabelde peptiden en peptidomimetics*", is op de DEC vergadering van 16 december 2011 besproken.

De DEC heeft één enkele vraag en/of opmerking:

- 1) Punt 7c- De DEC vraagt zich af of voor alle 4 de experimenten, zowel het tumorcontrolemodel als ook de controletracers, dienen te worden gecombineerd.

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 2011-163, gelieve dit nummer in verdere correspondentie te vermelden.

De DEC-UM wenst u en uw familie fijne feestdagen en een voorspoedig en vooral gezond 2012!

Hoogachtend,

Voorzitter DEC-UM

From: ...
Sent: woensdag 21 december 2011 17:17
To: (...)
Cc:
Subject: RE: Project 2011-163-w
Attachments: 20111221_DEC aanvraag_angiogenese imaging_MQ-683-11.docx

Beste secretaris DEC ...

In antwoord op de vragen/opmerkingen van de DEC naar aanleiding van projectaanvraag 2011-163:

De DEC heeft één enkele vraag en/of opmerking:

- 1) Punt 7c- De DEC vraagt zich af of voor alle 4 de experimenten, zowel het tumorcontrolemodel als ook de controletracers, dienen te worden gecombineerd.

Er worden in deze aanvraag twee tumormodellen gebruikt: MDA-MB-231-LITG en LS174T. MDA-MB-231-LITG brengt wel galectine-1 tot expressie en LS174T niet. De endotheelcellen die angiogenese ondergaan tijdens tumorgroei (die angiogene factoren tot expressie brengen, waaronder galectine-1) zijn niet afkomstig van de tumor, maar van de gastheer. Om deze reden zou je verwachten dat in beide tumormodellen expressie van galectine-1 zal plaatsvinden en dat binding van de tracer kan optreden. De expressie van galectine-1 op de MDA-MB-231-LITG tumorcellen zou tot additionele binding van tracer kunnen leiden. Om uit te sluiten dat er non-specifieke ophoping van de tracer optreedt, zal dit in beide tumormodellen moeten worden aangetoond met de controle tracers (non-specifieke ophoping kan verschillen per tumormodel).

Experiment 1: uit dit experiment zal blijken of er tumoropname met de drie positieve tracers in de twee tumormodellen optreedt en of de twee bijbehorende controle tracers geen/minder tumoropname in beide tumormodellen vertonen.

Aan de hand van deze resultaten kan besloten worden om met 1 tumormodel verder te gaan (omdat beide tumormodellen bv vergelijkbare tumoropname laten zien) of om beide tumormodellen te gebruiken, maar niet de combinatie van het twee tumormodel en controle tracers (omdat in dit tweede model geen opname te zien is) of om beide tumormodellen te gebruiken en de controle tracers in beide modellen (omdat er duidelijk verschil te zien is in tumoropname tussen de twee tumormodellen, die galectine-1 specifiek is).

Bovenstaande overweging is in de aanvraag bij punt 7c toegevoegd en in grijs gemarkeerd.

Hopende hiermee afdoende de vraag van de DEC te hebben beantwoord,

Met vriendelijke groet,

Phone +31
 Email:

From: ...
Sent: Monday 19 December 2011 13:56
To: ...

Subject: Project 2011-163-w

Geachte onderzoeker,

Uw projectaanvraag is in de DEC-UM – vergadering van 16 december 2011 besproken.

De uitslag treft u aan in bijgaand attachment.

Voortaan zult u uit efficiency overweging geen schriftelijke bevestiging meer ontvangen per post wanneer het een wijzigingsbrief betreft.

De DEC verzoekt U in een brief de vragen van de DEC te beantwoorden en de wijzigingen in het protocol duidelijk grijs te markeren, zodat het bij het kopiëren ook zichtbaar is.

Aanvragen die zonder brief of niet compleet worden aangeleverd, zullen niet in behandeling worden genomen door de DEC-UM.

Wanneer uw aanvraag is aangehouden, staat dit in de brief en moet de herziene versie terug naar gehele DEC.

De eerstvolgende vergadering is 27 januari 2012. Conceptaanvragen dienen 5 januari 2012 binnen te zijn.

De DEC-UM wenst u en uw familie fijne feestdagen en een voorspoedig en vooral gezond 2012!

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

Postbus 616-I

6200 MD Maastricht

E-mail: _____

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

The information contained in this message may be confidential and legally protected under applicable law. The message is intended solely for the addressee(s). If you are not the intended recipient, you are hereby notified that any use, forwarding, dissemination, or reproduction of this message is strictly prohibited and may be unlawful. If you are not the intended recipient, please contact the sender by return e-mail and destroy all copies of the original message.

From:**Sent:** maandag 16 januari 2012 16:59**To:** [**Subject:** RE: Project 2011-163-w**Attachments:** 20120116_DEC aanvraag_angiogenese imaging_MQ-683-11_aangepast.docx

Beste secretaris DEC

In antwoord op de opmerking van de DEC is aanvullende tekst toegevoegd in het protocol:

Toegevoegd bij punt 7c

Experiment 1:

... Ook zal op basis van dit experiment besloten worden of het nodig is met beide tumormodellen (MDA-MB-231-LITG en LS174T) in experiment 3 verder te gaan, of dat 1 model volstaat....

Experiment 3:

Aan de hand van de resultaten van experiment 1 en 2 wordt besloten is of er met 1 of 2 tumormodellen verder wordt gegaan in experiment 3 (3 opties):

- 1) Beide tumormodellen laten vergelijkbare tumoropname zien
(%injected dose/g tumor: verschil is kleiner dan 25%):
gebruik van 1 tumormodel in experiment 3
($5 \times 5 \times 1 \times 3 + 5 \times 5 \times 1 = 75 + 25 = 100$)
- 2) Eén tumormodel laat tumoropname zien, andere tumormodel laat geen tumoropname zien
(tumoropname: ratio %injected dose/g in tumor/bloed is groter dan 3; geen tumoropname: ratio %injected dose/g in tumor/bloed is kleiner dan 3):
gebruik van beide tumormodellen, maar niet de combinatie van het tweede tumormodel en controle tracers in experiment 3
($5 \times 3 \times 2 \times 3 + 5 \times 2 \times 1 \times 3 + 5 \times 3 \times 2 + 5 \times 2 \times 1 = 90 + 30 + 30 + 10 = 160$)
- 3) Beide tumormodellen laten tumoropname zien, maar opname is beduidend anders (galectine-1 specifiek effect)
(%injected dose/g tumor: verschil is groter dan 25%):
Gebruik van beide tumormodellen en de controle tracers in beide modellen in experiment 3
($5 \times 5 \times 2 \times 3 + 5 \times 5 \times 2 = 150 + 50 = 200$)

Wanneer beide tumormodellen geen tumoropname laten zien (ratio %ID/g in tumor/bloed is kleiner dan 3), dan wordt niet verder gegaan met de studie.

Graag hoor ik of dit voldoet aan het verzoek van de DEC, of dat nog aanvullende/gewijzigde tekst verlangd wordt.

Met vriendelijke groet

 Phone +

18-1-2012

Email: info@dec-um.nl

From:
Sent: Monday 16 January 2012 14:07
To: V
Subject: FW: Project 2011-163-w

Geachte onderzoeker, beste

Allereerst mijn oprechte excuses dat dit lang geduurd heeft, maar een en ander heeft te maken gehad met de vakantie van de DEC.

De DEC is nog niet helemaal teverden met het antwoord.

Opmerking:

De DEC zou graag de concrete toezegging hebben dat het aantal tumormodellen tot 1 teruggebracht wordt zodra de experimenten uitwijzen dat de modellen identiek reageren en hier in het design rekening mee wordt gehouden (gefaseerd) ihkv reductie. Nu wordt enkel opgemerkt '...kan besloten worden om met 1 model verder te gaan...'. Waar ligt de lijn voor wel of niet verder gaan met alle modellen?

Graag je reactie.

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie
 Postbus 616-UI, 6200 MD Maastricht
 T: 06-1111 1111
 E-mail: info@dec-um.nl

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

From:
Sent: woensdag 21 december 2011 17:17
To:
Cc:
Subject: RE: Project 2011-163-w

Beste secretaris DEC

In antwoord op de vragen/opmerkingen van de DEC naar aanleiding van projectaanvraag 2011-163:

De DEC heeft één enkele vraag en/of opmerking:

- 1) Punt 7c- De DEC vraagt zich af of voor alle 4 de experimenten, zowel het tumorcontrolemodel als ook de controletracers, dienen te worden gecombineerd.

Er worden in deze aanvraag twee tumormodellen gebruikt: MDA-MB-231-LITG en LS174T. MDA-MB-231-LITG brengt wel galectine-1 tot expressie en LS174T niet. De endotheelcellen die angiogenese ondergaan tijdens tumorgroei (die angiogene factoren tot expressie brengen, waaronder galectine-1) zijn niet afkomstig van de tumor, maar van de gastheer. Om deze reden zou je verwachten dat in beide tumormodellen expressie van galectine-1 zal plaatsvinden en dat binding van de tracer kan optreden. De expressie van galectine-1 op de MDA-MB-231-LITG tumorcellen zou tot additionele binding van tracer kunnen leiden. Om uit te sluiten dat er non-specifieke ophoping van de tracer optreedt, zal dit in beide tumormodellen moeten worden aangetoond met de controle tracers (non-specifieke ophoping kan verschillen per tumormodel).

18-1-2012

Experiment 1: uit dit experiment zal blijken of er tumoropname met de drie postieve tracers in de twee tumormodellen optreedt en of de twee bijbehorende controle tracers geen/minder tumoropname in beide tumormodellen vertonen.

Aan de hand van deze resultaten kan besloten worden om met 1 tumormodel verder te gaan (omdat beide tumormodellen bv vergelijkbare tumoropname laten zien) of om beide tumormodellen te gebruiken, maar niet de combinatie van het twee tumormodel en controle tracers (omdat in dit tweede model geen opname te zien is) of om beide tumormodellen te gebruiken en de controle tracers in beide modellen (omdat er duidelijk verschil te zien is in tumoropname tussen de twee tumormodellen, die galectine-1 specifiek is).

Bovenstaande overweging is in de aanvraag bij punt 7c toegevoegd en in grijs gemarkeerd.
Hopende hiermee afdoende de vraag van de DEC te hebben beantwoord,

Met vriendelijke groet,

Phone:
Email:

From:
Sent: Monday 19 December 2011 13:56
To:
Subject: Project 2011-163-w

Geachte onderzoeker,

Uw projectaanvraag is in de DEC-UM – vergadering van 16 december 2011 besproken.

De uitslag treft u aan in bijgaand attachment.

Voortaan zult u uit efficiency overweging geen schriftelijke bevestiging meer ontvangen per post wanneer het een wijzigingsbrief betreft.

De DEC verzoekt U in een brief de vragen van de DEC te beantwoorden en de wijzigingen in het protocol duidelijk grijs te markeren, zodat het bij het kopiëren ook zichtbaar is.

Aanvragen die zonder brief of niet compleet worden aangeleverd, zullen niet in behandeling worden genomen door de DEC-UM.

Wanneer uw aanvraag is aangehouden, staat dit in de brief en moet de herziene versie terug naar gehele DEC.

De eerstvolgende vergadering is 27 januari 2012. Conceptaanvragen dienen 5 januari 2012 binnen te zijn.

De DEC-UM wenst u en uw familie fijne feestdagen en een voorspoedig en vooral gezond 2012!

Met vriendelijke groet namens DEC-UM:

Ambtelijk Secretaris Dierexperimentencommissie

Postbus 616-1 6200 MD Maastricht
T:
E-mail:

Werktijden: Ma-Di-Wo-Don van 08.00 uur tot 16.00 uur

18-1-2012



Aan: _____

Ons kenmerk

Doorkiesnummer

Maastricht
19-01-2012

Project: *SPECT en PET imaging van angiogenese met behulp van nucleair gelabelde peptiden en peptidomimetics.*

DEC-UM
Voorzitter DEC-UM

Verantwoordelijk onderzoeker (VO):

p/a secretariaat DEC-UM

Namens de Vergunninghouder van de DEC-UM, delen wij u mede dat voornoemd project aan de ethische toetsingscriteria voor proefdiergebruik voldoet.

Secretariaat DEC-UM
T.

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

Bezoekadres

Projectnummer: 2011-163

Diersoort: muis

Aantal dieren: 425

Einddatum: 19-01-2016

Postadres
Postbus 616
6200 MD Maastricht

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

Vicevoorzitter ~~DEC-UM~~