

The arguments described above have been incorporated into section 3.4.2 of the project proposal as follows: *"We want to investigate (in the circulation) the effects of perinatal stress on pulmonary and immunological outcome during the transition from fetus into childhood till adulthood. Perinatal stress is associated with direct pulmonary pathologies, including BPD, and with increased risk of lung pathologies at adulthood, including airway hyper-reactivity. As a consequence, such latter disturbances can only be proven at adulthood, which is from 1 year onwards in sheep."*

### **3.4.3**

#### **Vragen:**

- 1. De DEC-UM vraagt de onderzoekers beter aan te geven wat de precieze go – nogo momenten zijn. Waarom moeten de verschillende losse groepen pre versus post nataal en de combinatie van deze twee allemaal gedaan worden?**

**Antwoord:** Pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a cell-based therapy (MAPC) on these individual factors. As a consequence, the different aims need to be investigated independently in order to define the best pharmaceutical regime.

In addition, pharmacological effects of perinatal treatment might emerge at different stages, and for instance become apparent for the first time during adulthood.

The arguments described above have been incorporated into section 3.4.3 of the project proposal as follows: *"Pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a cell-based therapy (MAPC) on these individual factors. As a consequence, the different aims need to be investigated independently in order to define the best pharmaceutical regime.*

*In addition, pharmacological effects of perinatal treatment might emerge at different stages, and for instance become apparent for the first time during adulthood. Therefore, In Aim 1 the effects of stem cell treatment in utero will be examined. Pharmacological effects need to be examined in the acute phase (during pregnancy, AIM 1) and at a later time point, being postnatally (AIMS 2A and 3A). The effects of postnatal stem cell treatment will be studied within 5 days after treatment (AIM 2B) or at adulthood (1 year, AIM 3B). Finally, the potential synergistic effects between combined in utero and postnatal treatment will be examined (AIMS 2C and 3C)."*

- 2. De DEC-UM gaat ervan uit dat als AIM 1 niet lukt (bijv. op inflammatie) er géén AIMS 2 en 3 zullen volgen, ongeacht dat dit verschillende tijdstippen zijn.**

**Antwoord:** As described in section 3.4.3 (go or no-go), pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a cell-based therapy (MAPC) on these individual factors. As a consequence, the different aims need to be investigated independently in order to define the best pharmaceutical regime.

In addition, pharmacological effects of perinatal treatment might emerge at different stages, and for instance become apparent for the first time during adulthood.



### **3.4.4**

#### **Appendix 1**

##### **Vragen:**

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

##### **1. De DEC-UM verzoekt de onderzoekers de verschillende uitkomst parameters per AIM uit te drukken.**

**Antwoord:** The outcome parameters as described in part A of Appendix 1 are identical for each experimental aim. In addition, at the end of the experiment the animals from AIM 3 (1-year survival) are subjected to an airway reactivity test as additional outcome parameter.

The arguments described above have been incorporated into section A of appendix 1 as follows: "*Primary outcome parameters for all experimental aims comprise lung inflammation, lung development, pulmonary vasculature, lung function, lung injury, lung remodeling, and systemic inflammation. In addition, airway reactivity will serve as a primary outcome parameter for AIM 3. Secondary outcome parameters for all experimental aims comprise ex vivo culture of organoids to assess molecular developmental pathways.*"

##### **2. De DEC-UM verzoekt U aan te geven waarom hier geen bijwerkingen van glucocortoids op andere organen wordt meegenomen.**

**Antwoord:** The use of corticosteroids in this model is a necessity for adequate lung maturation and mechanical ventilation. This procedure is standard clinical care in the case of pending preterm delivery. A study conducted in our translational chorioamnionitis model in sheep conducted by our group demonstrated that maternal corticosteroids resulted in lung maturation (as required), but had no effects on fetal pulmonary, cerebral and systemic inflammatory response (10, 14-16).

##### **B. De dieren.**

##### **3. De DEC-UM merkt op dat de geschatte uitval gelijk is aan het percentage dieren waarbij naar schatting van de onderzoekers een humaan eindpunt van toepassing is, in J.**

**Er lijken ook hier meer redenen voor uitval mogelijk dan het bereiken van humane eindpunten. Zo ja, dan dient het percentage drop-outs hoger te zijn dan dat bij humane eindpunten.**

**Antwoord:** Animal health, well-being and welfare are monitored extensively during the entire experiment by well-trained and experienced personnel according to standardized protocols. Also, lambs that survive long-term will receive standardized animal care, including (mandatory) vaccinations, health-checks by the Art. 14 welfare officer / veterinarian, shearing, and trimming of the hooves. Also housing conditions are optimized to prevent disease (prevention heat stress). If necessary, additional care will be provided in consultation with the art. 14 welfare officer / veterinarian. As such, and in consultation with the Art. 14 of Maastricht University, we do not expect drop-out other than the reaching of a humane endpoint.



**D. Vervanging, vermindering en verfijning.**

- 4. Zoals eerder aangegeven vraagt de DEC-UM de onderzoekers aan te geven waarom in sommige gevallen niet kan volstaan met *in vitro* werk. Verder verzoekt de DEC-UM de onderzoekers hier aan te geven waarom AIM 2B en 3B nodig zijn, aangezien deze in de literatuur onbevredigende resultaten hebben getoond. De DEC-UM vraagt zich daarom af waarom deze experimenten geïnccludeerd zijn.**

**Antwoord:** Lung function following antenatal infection/inflammation and MAPC treatment is described as a primary outcome parameter in our study. This physiological parameter cannot be assessed *in vitro* and, therefore, requires *in vivo* assessment.

In addition, since pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a novel cell-based therapy (MAPC) on these individual factors. We postulate that for improvement of the functional capacity of the preterm lung, inflammation and lung development must be targeted at the earliest moment, being *in utero*. Moreover, we investigate whether the pharmacological effects of stem cell administration will be enhanced by combined antenatal and postnatal administration. To test these different pharmacological regimes, effects of stem cell treatment need to be compared in the proposed groups. Besides BPD, perinatal stress is strongly correlated with pulmonary pathologies, including pulmonary hyperreactivity. These later airway diseases become apparent during adulthood. Therefore, a long-term follow-up of the different perinatal treatment regimes that will be tested is essential.

The arguments described above have been incorporated into section A of appendix 1 as follows:

**Replacement:**

*"In addition, lung function following antenatal infection/inflammation and MAPC treatment is described as a primary outcome parameter in our study.*

*This physiological parameter cannot be assessed in vitro and, therefore, requires in vivo assessment in our preclinical animal model."*

**Reduction:**

*"Pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). Therefore, we aim to investigate the effects of a novel cell-based therapy (MAPC) on these individual factors. We postulate that for improvement of the functional capacity of the preterm lung, inflammation and lung development must be targeted at the earliest moment, being in utero. Moreover, we investigate whether the pharmacological effects of stem cell administration will be enhanced by combined antenatal and postnatal administration. To test these different pharmacological regimes, effects of stem cell treatment need to be compared in the proposed groups."*

**I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen.**

- 4. Is er een specifieke reden om mastitis bij de ooi te verwachten?**

**Antwoord:** There is no particular reason to expect mastitis in the ewes. Consequently, we have removed this item from the list.

- 5. Is in de verklaring van de mogelijke ondervoeding het woord 'lack' wel van toepassing?**

**Antwoord:** The word lack indeed is not appropriate in this sentence. Malnutrition can occur by motherless rearing and not by the absence of motherless rearing. Therefore the word "lack" is removed from this sentence.



## Bijlage II:

### Vragen DEC-UM d.d. 30-11-2016 en antwoorden VO d.d. 01-12-2016

1. De DEC-UM vraagt de onderzoekers te onderbouwen waarom men eerst (prenataal) wil behandelen, en als vroege (prenatale) behandeling werkt (of eventueel vroeg/prenataal + laat/postnataal), je het effect laat/neonataal moeten kunnen terugzien. Hierdoor dan is het volgens de DEC-UM niet nodig èn vroeg (AIM 1) èn laat (AIM 2A) te onderzoeken (en dus meer dieren). De DEC-UM stelt daarom voor eerst laat te onderzoeken (AIM 2A) en indien effect, ook vroeg (AIM 1). Dit lijkt de DEC-UM een cruciaal go/no-go in deze aanvraag.

**Antwoord:** Pulmonary diseases in early and later life find their origin in both prenatal (antenatal infection/inflammation) and postnatal factors (mechanical ventilation). It is essential to investigate the individual and combined contributions of these stress factors and the pharmacological effects of MAPC herein. As an example, neonates might be born prematurely with chorioamnionitis between 32 and 37 weeks of gestation as a crucial inducer of preterm labour but these children are not in need of mechanical ventilatory support. For this group, findings of aim 1 are key. Alternatively, children born between 24-32 weeks might be born that early irrespective of chorioamnionitis (35% of the cases) and need ventilatory support. For these individuals, data of aim 2 will be essential.

2. De DEC-UM is niet overtuigd van het antwoord op 3.4.4 (bijwerkingen glucocorticoiden) omdat het niet alle mogelijke bijwerkingen omschrijft. Er zijn veel artikelen gepubliceerd van deze groep die op vele hersen-gerelateerde neveneffecten van dit soort behandelingen wijzen (in de rat). Dat de onderzoekers nu in het schapenmodel geen inflammatie terugvinden beantwoordt de vraag van de DEC-UM niet.

**Antwoord:** Glucocorticoids are routinely administered to women at risk for preterm delivery to accelerate maturation of the fetal lungs, so preterm infants can better transition at birth. The introduction of antenatal corticosteroid treatment has reduced respiratory distress syndrome rates by 34% and neonatal death rates by 31%, making it the cornerstone of modern perinatal care. As such, maternal administration of glucocorticoids in our model is a prerequisite for optimal postnatal ventilation. Indeed adverse effects after corticosteroid administration on brain development have been reported. However, these effects are induced when corticosteroids are administered postnatally as a treatment for the prevention of chronic lung disease. In contrast to postnatal administration; antenatal maternal glucocorticoid administration is associated with a reduced risk for adverse neurodevelopmental outcomes (1). In addition, as indicated before, maternal administration of corticosteroids in our ovine chorioamnionitis models was not associated with adverse effects on different organs (i.e. brain, lung, peripheral immune organs) in the fetus.

3. 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 ongerief ondervinden dat voor de ooiën en eenjarige lammeren wordt geclassificeerd als matig en voor de pasgeboren lammeren als gering. Heet dat niet non-recovery? De pasgeboren lammeren worden ofwel onmiddellijk ofwel na 5 dagen onder narcose opgeofferd.



24 mei 2016

**Antwoord:** For the severity classification we have agreed with the recommendations of the IvD that the experiments in aims 1 and 2 are both to be classified as mild. The argument for this classification was that during *in utero* infection/inflammation fetuses (who are not anesthetized at that point) might display signs of physical discomfort due to a systemic inflammatory response.





> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Maastricht

10.2 .e. en g

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie**

**Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD107002016784-8

**Bijlagen**

3

Datum 9 oktober 2020

Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geacht 10.2 .e. en g

Op 20 augustus 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Multipotent adult progenitor cells: a promising therapy for adverse pulmonary outcomes in the course of perinatal stress." met aanvraagnummer AVD107002016784-8. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf de datum van deze brief is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 30 januari 2017 tot en met 1 januari 2023.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC-UM (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 14 september 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### **Overwegingen**

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.



**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 93118, 2509 AC Den Haag.

**Datum:**

9 oktober 2020

**Aanvraagnummer:**

AVD107002016784-8

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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

10.2 .e. en g

Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

- Projectvergunning
- 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 wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 30 januari 2017 tot en met 1 januari 2023, voor het project "Multipotent adult progenitor cells: a promising therapy for adverse pulmonary outcomes in the course of perinatal stress." met aanvraagnummer AVD107002016784-8, na advies van dierexperimentencommissie DEC-UM.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 20 augustus 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 14 september 2020;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 14 september 2020;
  - c Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 14 september 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief	Overige opmerkingen
<b>3.4.4.1 Perinatal stress with postnatal survival</b>				231 volwassen schapen (oaien) en 231 jongen
	Schapen ( <i>Ovis aries</i> )	448 / 462	21,5% Matig 78,5% Licht	

### Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.





**Aanvraagnummer:**  
AVD107002016784-8

## 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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 van de wet 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



**Aanvraagnummer:**

AVD107002016784-8

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

**Einde van een dierproef**

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

Volgens artikel 13b van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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.





## Format

### Projectvoorstel dierproeven

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

## 1 Algemene

gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

## 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 of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

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

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



Een tumor heeft zuurstof en voedingsstoffen nodig om te kunnen groeien. Deze worden naar de tumor aangevoerd via bloedvaten. Om verder te kunnen groeien zal een tumor dus de groei van bloedvaten stimuleren. Deze bloedvatvorming wordt ook wel angiogenese genoemd. Remming van angiogenese (ook wel anti-angiogenese of angiostasis genoemd) is dus een aantrekkelijke strategie voor de behandeling van kanker. Deze strategie is breed toepasbaar op verschillende solide tumoren, omdat vrijwel alle solide tumoren afhankelijk zijn van angiogenese. Op dit moment worden anti-angiogene middelen in de kliniek toegepast. Er is een duidelijke verlenging van overleving vastgesteld. Echter, deze overlevingsverlenging is zeer beperkt te noemen. Bijvoorbeeld, de toevoeging Avastin (een antilichaam tegen de belangrijkste angiogene factor) aan de chemotherapie van colonkanker geeft een gemiddelde overlevingsverlenging van ongeveer 3-4 maanden.

Een doel van dit onderzoek is dan ook het ontwikkelen van een optimale strategie voor het remmen van de tumorangiogenese. Wij denken dat vaccinatie tegen de tumorvasculatuur - al dan niet in combinatie met gerichte geneesmiddelen (targeted therapy) of andere vormen van immunotherapie - een veelbelovende strategie is om dit te bereiken. Tevens is dit project bedoeld om imaging tools (beeldvormende technieken, zoals MRI en PET) te ontwikkelen voor verbetering van de diagnostiek van solide tumoren. Dit heeft als voordeel dat kankerpatiënten gerichter behandeld kunnen worden en patiënten, die baat hebben bij een bepaalde therapie, geselecteerd kunnen worden. De huidige behandeling van niercel- en colonkanker is verre van optimaal en kan worden verbeterd door het kiezen van een optimale combinatie van geneesmiddelen.

### **Nieuwe targets (antigenen) in de tumorbloedvaten**

Voor een efficiënte en veilige remming van de tumorangiogenese zijn specifieke en selectieve markers van het tumorvaatbed nodig. 10.2 e. en g

[redacted]. Kort gezegd de tumorbloedvaten bevatten dus unieke eiwitmarkers (targets) waartegen we specifiek geneesmiddelen kunnen richten.

Tegen deze nieuwe en unieke eiwitten in de tumorbloedvaten willen we vaccins, antilichamen en nanobodies maken en testen of deze in muismodellen de tumorbloedvatvorming en tumorgroei kunnen remmen. De vaccins, antilichamen en nanobodies zullen tevens getest worden in combinatie met

- (i) chemo- & gerichte therapie. Voor chemotherapie zijn dit de middelen die tegenwoordig gebruikt worden zoals docetaxel, doxorubicine, carboplatin en 5-fluorouracil. Met gerichte therapie worden middelen bedoeld - vaak kleine organisch chemische middelen - die specifiek bepaalde receptoren blokkeren, zoals sunitinib (VEGF receptoren), erlotinib (EGF receptoren), imatinib (PDGF receptoren), lapatinib (HER2).
- (ii) immunologische 'checkpoint inhibitors'. Deze laatste zijn geneesmiddelen die de immunologische afweer kunnen deblokken zodat een efficiënte afweer tot stand komt.

Daarnaast zullen *in vitro* gevalideerde combinatietherapieën voor de behandeling van niercel en kolon kanker getest worden in tumormodellen in muizen. Verder zullen de ontwikkelde antilichamen en nanobodies worden gebruikt voor het zichtbaar maken van de tumorbloedvaten; zogenaamde imaging of beeldvorming ten behoeve van verbeterde diagnostiek.

### **Vaccinatie**

Een van de behandelingsstrategieën, die we gaan toepassen is het vaccineren tegen de tumorbloedvaten. Tot op heden is het moeilijk gebleken om tegen kanker te vaccineren. De redenen hiervoor zijn de volgende. Ten eerste moet men (dikwijls) vaccineren tegen een lichaamseigen eiwit. Het immuunsysteem (de afweer) in het lichaam heeft een tolerantie tegen lichaamseigen eiwitten ontwikkeld, om een immunoreactie tegen eigen weefsels (autoimmunziekte) te voorkomen. Deze tolerantie is dan ook moeilijk te breken. Ten tweede hebben tumorcellen tevens verschillende mechanismen ontwikkeld om aanvallen van het immuunsysteem te ontwijken. [redacted]

Om de immuuntolerantie van het lichaam te kunnen breken tegen tumorbloedvat-specifieke lichaamseigen eiwitten zullen deze eiwitten aan een lichaamsvreemd eiwit worden gekoppeld (bijv. een bacterie- of gistewit). Deze fusie-eiwitten, die door bacterien worden gemaakt (recombinant), worden met een krachtig adjuvans (een immuunsysteem versterkend middel) onderhuids geïnjecteerd. In de figuur is de immunoreactie, die in het lichaam op zal treden na injectie van het fusie-eiwit, nader toegelicht. Het vaccin

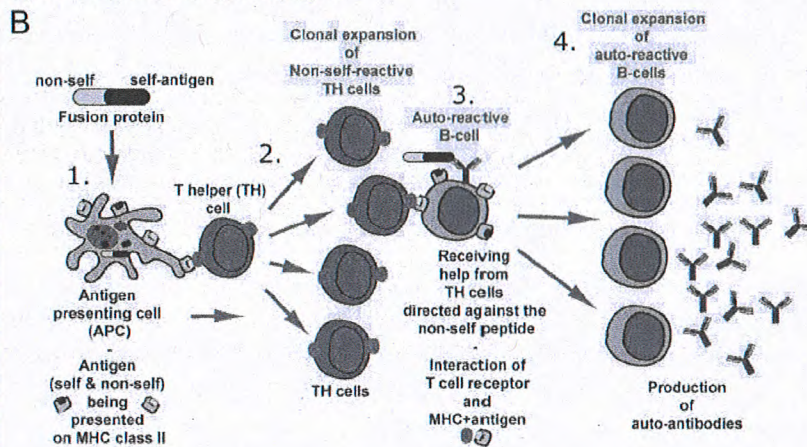


zal het immuunsysteem stimuleren om cellen/weefsels, die een bepaald molecuul tot expressie brengen, bijvoorbeeld de tumorbloedvaten, aan te vallen en te vernietigen.

10.2 .e. en g

**Figuurtekst:**

1) Antigen presenterende cellen (APC's) nemen het fusie-eiwit (bacteriedeel + lichaamseigen deel) op en presenteren lichaamsvreemde en lichaamseigen peptiden. 2) T-cellen (TH) herkennen lichaamsvreemde peptiden en worden daardoor geactiveerd. Lichaamseigen peptiden worden niet herkend door T-cellen omdat er geen auto-reactieve T-cellen in het lichaam aanwezig zijn. 3) Autoreactieve B-cellen herkennen het lichaamseigen deel van het fusie-eiwit en presenteren peptiden van het lichaamseigen en het lichaamsvreemde deel. De eerder door het lichaamsvreemde deel van het fusie-eiwit geactiveerde T-cellen zullen de autoreactieve B-cellen activeren omdat deze eveneens lichaamsvreemde peptiden presenteren. 4) De autoreactieve B-cellen vermenigvuldigen zich en produceren antilichamen tegen het lichaamseigen antigen.



**Veiligheid van de vaccinatie**

Onze vaccines zijn specifiek gericht tegen de tumorvasculatuur. Echter, een zeer lage expressie van de target in gezonde weefsels zou eventuele bijwerkingen kunnen geven, bijvoorbeeld wanneer de vaccins op termijn ook de normale bloedvaten van de gezonde organen aangrijpen. Daarom is het belangrijk te onderzoeken wat de lange termijn effecten van de vaccinatie op het lichaam zijn. Hiervoor zullen we wild type muizen vaccineren en deze gedurende een periode van maximaal twee jaar volgen. Regelmatig zal bij deze muizen bloed worden afgenomen om antilichaam titers te bepalen. Aan het einde van de proef, na het opofferen van de muizen, zullen de organen worden bestudeerd om eventuele toxiciteit van de vaccinatie vast te kunnen stellen.

10.2 .e. en g

. De vorming/aanmaak van nieuwe bloedvaten vanuit bestaande bloedvaten (angiogenese) is een centraal proces in wondgenezing, de foetale/embryonale ontwikkeling en de menstruatiecycclus. De

10.2 .e. en g

te onderzoeken wat de effecten van de ontwikkelde vaccins zijn op wondgenezing en fertiliteit, waarin fysiologische angiogenese optreedt. Dit is de reden dat de onderdelen 'wondgenezing en fertiliteit' zijn toegevoegd aan type dierproef 1 van dit projectvoorstel.

**Combinatietherapie**

Het is algemeen aanvaard dat een optimale chemotherapie of 'targeted therapy' bestaat uit een combinatie van geneesmiddelen. De combinatie van geneesmiddelen zal leiden tot een verlaging van de dosis van elk van de afzonderlijke geneesmiddelen. Hierbij wordt een lagere toxiciteit (minder bijwerkingen) en een verminderde resistentie verwacht. Op zichzelf kan dit dan een zeer verbeterde behandelingvorm zijn. Maar de ontwikkelde vaccins, monoklonale antilichamen en nanobodies zullen in combinatie met deze optimale targeted therapy en chemotherapie getest worden. Daarnaast zullen de



vaccins, monoklonale antilichamen en nanobodies, getest worden in combinatie met immunomodulatoire strategieën met de zogenaamde checkpointinhibitoren.

### **Monoklonale antilichamen/nanobodies en beeldvormingstechnieken (imaging)**

Beeldvormende technieken worden gebruikt bij de diagnose van kanker, maar zijn nog niet erg specifiek. Moleculaire imaging (bijv. het zichtbaar maken van actieve angiogenese) kan helpen (i) de diagnostiek te verbeteren, (ii) de respons op therapie te meten, of (iii) om (patient-specifieke) behandelingsbeslissingen te nemen. Hiervoor zijn antilichamen nodig. Doormiddel van de hierboven beschreven vaccinatiestrategie zullen antilichamen tegen de verschillende targetgenen worden opgewekt. De milt van de gevaccineerde muizen zal worden gebruikt voor verdere productie van monoklonale antilichamen (MAbs). Nanobodies worden gemaakt in samenwerking met andere onderzoekers. De ethische toestemming voor het maken van deze nanobodies zal verkregen worden door de laboratoria van deze samenwerkende onderzoekers. Nanobodies zijn zeer kleine antilichaam moleculen die een voordeel hebben voor wat betreft penetratie in weefsels. Deze probes (MAbs en nanobodies) zullen gebruikt worden om het effect van passieve vaccinatie op de tumorgroei te bestuderen in syngene tumormodellen, dus muizen met muizen tumorcellen. Maar de probes zullen ook worden getest in xenograft modellen, dus in muizen met menselijke tumorcellijnen. Xenograft modellen worden gebruikt om snelle effecten van de therapie te kunnen meten. Een ander voordeel van een xenograft model ten opzichte van een syngene model is dat er naar muis en humaan specifieke effecten kan worden gekeken met behulp van polymerase chain reaction (PCR). Verder zijn de xenograft modellen aantrekkelijk vanwege het gebruik van menselijke tumorcellen. Syngene tumormodellen hebben het voordeel van de interactie van de tumor en het immuunsysteem van de gastheer. Hierdoor is een betere vergelijking met de situatie in kankerpatiënten mogelijk.

De antilichamen en nanobodies zullen met specifieke chemie worden behandeld om er een tracer molecuul van te maken. Dit kan bijvoorbeeld met gadolinium zodat de antilichamen paramagnetisch worden en gebruikt kunnen worden voor MRI beeldvorming of met een isotoop zodat PET scanning mogelijk wordt.

### **3.2 Doel**

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

### **Hoofddoel**

De hoofddoelen van dit onderzoek zijn de ontwikkeling van verbeterde anti-kanker therapieën en diagnostiek. Dit wordt gedaan door het ontwikkelen van vaccins, antilichamen en nanobodies tegen antigenen (targets) in de tumorbloedvaten. Een tweede doel is het ontwikkelen van een optimale combinatie van targeted therapy met small molecule inhibitors voor de behandeling van niercel- en colon tumoren. De nieuwe vaccins en antilichamen/nanobodies zullen getest worden als monotherapie, en na validatie ook in combinatie met (i) chemotherapie, (ii) targeted therapy en (iii) checkpointinhibitoren. Tevens zal voor de nieuwe antilichamen/nanobodies worden getest of dat deze geschikt zijn voor imaging van de tumorbloedvaten.

### **Onderzoeksvragen**

We verwachten binnen de looptijd van het onderzoek antwoord op de volgende vragen:

- Worden er na vaccinatie antilichamen tegen de targets aangemaakt?
- Kunnen de vaccins het ontstaan van tumoren voorkomen of remmen?
- Is vaccinatie tegen de verschillende targets veilig?
- Worden naast de antilichamen ook cytotoxische T cellen (CD8<sup>+</sup>) gevormd tegen de targets?
- Kunnen de antilichamen of nanobodies selectief de tumorgroei remmen?
- Wat is de beste combinatie van targeted therapy voor niercel- of kolonkanker?
- Kunnen de nieuwe vaccins en antilichamen/nanobodies chemotherapie of targeted therapy verbeteren?
- Kunnen de nieuwe vaccins en antilichamen/nanobodies therapie met checkpointinhibitoren verbeteren?



- Kunnen de antilichamen of nanobodies gebruikt worden voor imaging (om de tumorbloedvaten zichtbaar te maken)?
- Binden deze antilichamen specifiek aan de tumorbloedvaten?
- Heeft vaccinatie effect op de wondgenezing en fertiliteit?

### **Haalbaarheid**

Voor de meeste van de voorgestelde experimenten zijn subsidies verkregen (Koningin Wilhelmina Fonds, Europese Commissie). Bij de aanpak zoals beschreven wordt verwacht dat de haalbaarheid van antwoorden op de bovengestelde vragen zeer groot is. Met de meeste van de voorgestelde experimenten is **10.2.g** veel expertise aanwezig, waarmee de haalbaarheid wordt vergroot. Voor enkele gespecialiseerde experimenten wordt samengewerkt met andere onderzoeksgroepen. De haalbaarheid is ook groot vanwege de gedetailleerde statistische analyse van het aantal benodigde proefdieren, waardoor het aantal tot een minimum zal worden beperkt.

### **3.3 Belang**

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

Het belang van dit werk is nieuwe kankermedicijnen te maken die op een biologische manier werken. Met andere woorden, middelen die uitsluitend een anti-tumor effect vertonen en geen bijwerkingen hebben. Dit kan alleen bereikt worden met biologische middelen (in tegenstelling tot chemotherapie). De targetgenen in de tumorbloedvaten, waar we in deze studie gebruik van maken zijn volledig nieuw, omdat deze uit een nog nooit eerder beschreven aanpak zijn voortgekomen. Vaccinatie tegen deze nieuwe antigenen (eiwitten) geeft ons tevens de mogelijkheid om antilichamen tegen deze targets te ontwikkelen, wat specifiekere en daarmee betere imaging van de tumorbloedvaten mogelijk zal maken. Dit is van belang omdat daarmee betere behandelingsbeslissingen voor patiënten gemaakt kunnen worden. Wanneer de targets tevens geschikt blijken te zijn voor vaccinatie dan zullen we hiermee verder gaan en uiteindelijk een vaccin ontwikkelen dat kan worden toegepast voor de behandeling van tumoren bij de mens. Tevens zullen monoclonale antilichamen en nanobodies worden ontwikkeld. Van nanobodies wordt verwacht dat deze een betere penetratie in het weefsel geven omdat ze veel kleiner zijn dan een antilichaam, waardoor we gericht kunnen targeten maar ook de tumorbloedvaten beter zichtbaar kunnen maken. Echter, de productie van nanobodies is niet eenvoudig en vaak treden complicaties op zoals bijv. het instabiel zijn van nanobodies. In die gevallen zal met reguliere monoclonale antilichamen gewerkt worden. Het testen van de hierboven beschreven strategieën met een panel aan nieuwe target antigenen (en nog te identificeren targets) in de tumorbloedvaten, zal dus de mogelijkheid geven om onze vaccinatiestrategie, imaging (beeldvorming) en targeting strategie te optimaliseren.

Het maatschappelijke belang van dit project is groot. Vooralsnog zijn er bij een groot deel van de kankerpatiënten, zeker in het geval van uitgezaaide kanker, weinig mogelijkheden voor therapie. Het grootste belang is dus dat er uitzicht komt op een nieuwe en betere strategie voor de behandeling van patiënten met uitgezaaide kanker, maar ook dat het effect van de bestaande kanker behandelingen mogelijk beter gemonitord (gevolgd) zal kunnen worden. Wanneer dit bereikt wordt zal de kwaliteit van leven van de kankerpatiënt worden verbeterd.

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

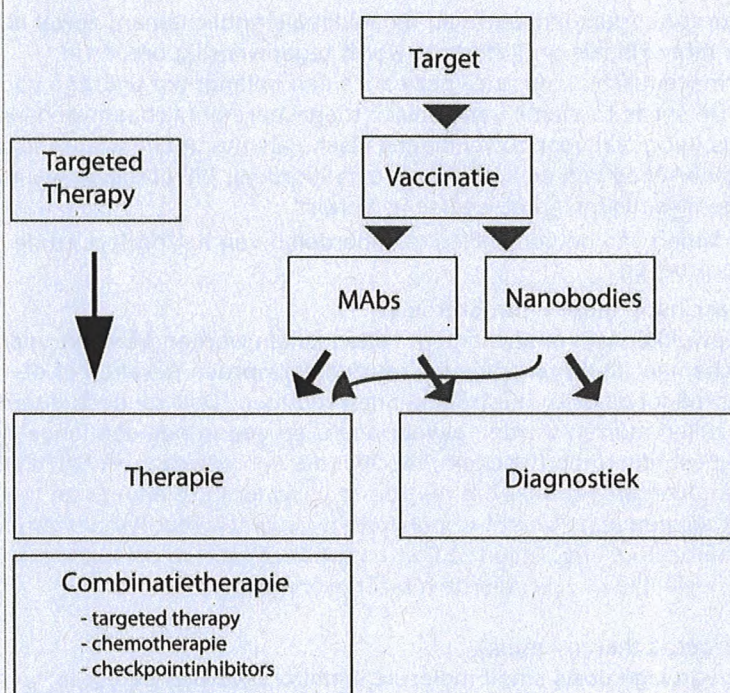
De algemene strategie van het project is om vaccins te testen tegen verschillende nieuwe targets in de tumorbloedvaten. We gebruiken hiervoor de boven beschreven vaccinatiestrategie. Als eerste willen we testen of dat onze vaccinatiestrategie voor de nieuwe targets werkt. Dit kunnen we testen door antilichamen tegen de target in het serum van gevaccineerde muizen aan te tonen. Wanneer er specifieke antilichamen tegen de target aantoonbaar zijn dan zal de effectiviteit van het vaccin op te tumorgroei worden bepaald.



De milten van gevaccineerde muizen zullen worden gebruikt voor de productie van monoklonale antilichamen. Deze monoklonale antilichamen worden vervolgens getest op hun anti-tumor effect. In samenwerking met andere onderzoekers zullen nanobodies worden gemaakt. (Productie van nanobodies is geen onderdeel van deze aanvraag.) Verder zullen de monoklonale antilichamen en nanobodies aan een tracer worden gekoppeld en voor imaging (diagnostiek) worden gebruikt.

Een onderdeel van deze aanvraag is het testen van het anti-tumor effect van een optimale combinatie van targeted therapy in nier- en colon-kanker modellen.

Uiteindelijk zal het effect of de tumorgroei van de meest succesvolle vaccins en monoklonale antilichamen worden getest in combinatie met de meest succesvolle targeted therapy, chemotherapie of checkpointinhibitors. In de figuur hieronder is een overzicht van de verschillende onderdelen van dit project en hun samenhang weergegeven.



Hierna is beschreven, welke proeven nodig zijn voor het beantwoorden van de in dit project gestelde onderzoeksvragen.

**Worden er na vaccinatie antilichamen tegen de targets aangemaakt?** Hiervoor is het nodig om een reeks vaccinatiestudies uit te voeren om vast te stellen of dat de immuuntolerantie kan worden doorbroken en of dat er antilichamen tegen de verschillende targets opgewekt kunnen worden (Type Dierproef 1). **Kunnen de vaccins het ontstaan van tumoren voorkomen of remmen?** Hiervoor is het nodig om het effect van de vaccins te testen in proefdieren met tumormodellen (Type Dierproef 1).

**Is vaccinatie tegen de verschillende targets veilig?** Hiervoor worden muizen gevaccineerd en de lange termijn effecten van vaccinatie op de normale organen bestudeerd (Type Dierproef 1). **Heeft vaccinatie effect op de wondgenezing en fertiliteit?** Muizen worden gevaccineerd met de ontwikkelde vaccins, waarvan is aangetoond dat deze remming van de tumorgroei laten zien, en het effect op wondgenezing en fertiliteit (het aantal pups) wordt bestudeerd (Type Dierproef 1).

**Worden naast antilichamen ook cytotoxische T cellen (CD8<sup>+</sup>) gevormd tegen de targets?** In het serum van gevaccineerde muizen zullen de verschillende isotypen IgG antilichamen worden gemeten met ELISA. Hieruit kan worden afgeleid of dat er sprake is van een cytotoxische T cel repons tegen de targets (Type Dierproef 1). **Kunnen de antilichamen of nanobodies selectief de tumorgroei remmen?** Hiervoor is het nodig om het effect van de antilichamen of nanobodies te testen in proefdieren met



tumormodellen (Type Dierproef 1). **Wat is de beste combinatie van targeted therapy voor niercel of kolon kanker?** Hiervoor zal een vooraf *in vitro* geteste combinatie van targeted therapy in proefdieren met nier- en kolon-tumormodellen worden getest (Type Dierproef 3). **Kunnen de nieuwe vaccins en antilichamen/nanobodies chemotherapie of targeted therapy verbeteren?** Om deze vraag te kunnen beantwoorden zal de combinatie van de verschillende therapieën onderzocht worden in proefdieren met tumormodellen (Type Dierproef 4). **Kunnen de nieuwe vaccins en antilichamen/nanobodies therapie met checkpointinhibitoren verbeteren?** Om deze vraag te kunnen beantwoorden zal de combinatie van de verschillende therapieën onderzocht worden in proefdieren met tumormodellen (Type Dierproef 4). **Kunnen de antilichamen of nanobodies gebruikt worden voor imaging?** De monoklonale antilichamen die zijn gemaakt (Type Dierproef 1) worden in proefdieren met tumoren getest (Type Dierproef 3). **Binden deze antilichamen specifiek aan de tumorbloedvaten?** Hiervoor is het nodig om de monoklonale antilichamen te koppelen aan een tracer, zodat specifiek naar opname in de tumorbloedvaten kan worden gekeken (Type Dierproef 2).

In het voorgestelde onderzoek wordt gebruik gemaakt van monoklonale antilichamen, zowel als van nanobodies. Het ontwikkelen van monoklonale antilichamen wordt tegenwoordig breed (in wetenschappelijke kringen en farmaceutische industrie) gezien als een belangrijke bijdrage voor verbetering van kankertherapie. De snelle toename van klinisch toepasbare antilichaam-geneesmiddelen onderstreept deze interesse. Dit is het geval voor zowel diagnostische als therapeutische toepassingen. In sommige gevallen heeft de ontwikkeling van een nanobody een voordeel, bijvoorbeeld wanneer toegenomen penetratie van het geneesmiddel in het weefsel is vereist.

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

#### **Beschrijving dierproeven 1 (vaccinatie muis + tumorgroei)**

Vaccinatie van muizen voor het opwekken van antilichamen. Milten zullen worden gebruikt voor de productie van monoklonale antilichamen. In tumordragende muizen zal worden gekeken of de vaccins/monoklonale antilichamen/nanobodies tumorgroei kunnen remmen. Ook zal bestudeerd worden of de vaccins veilig zijn. Daartoe zullen muizen worden gevaccineerd en gedurende een lange tijd worden vervolgd. Organen zullen worden bestudeerd op toxiciteit. Vaccins, die een bewezen effect hebben op remming van de tumorgroei, zullen worden gebruikt om muizen te vaccineren. Wanneer de muizen antilichamen hebben aangemaakt zal een oppervlakte wond worden geplaatst met behulp van een biopsy punch en de wondgenezing worden bestudeerd. Tevens zal er naar het effect van de vaccinatie op de fertiliteit (het aantal pups) van vrouwelijke gevaccineerde muizen worden gekeken.

#### **Beschrijving dierproeven 2 (targeted therapy muis)**

*In vitro* gevalideerde combinaties van lage dosis small molecule inhibitors worden getest in tumordragende muizen. Het anti-tumor effect van deze combinaties zal worden getest, waarna deze zal worden vergeleken met effecten van de afzonderlijke (lage dosis) geneesmiddelen, een optimale concentratie van een regulier (klinisch toepasbaar) small molecule geneesmiddel (sunitinib), of geen therapie.

#### **Beschrijving dierproeven 3 (vaccins/MABs/nanobodies in combinatie met andere therapieën)**

Tumordragende muizen zullen behandeld worden met vaccins/monoklonale antilichamen/nanobodies met of zonder (i) chemotherapie, (ii) targeted therapy of (iii) checkpointinhibitoren.

#### **Beschrijving dierproeven 4 (imaging muis)**

De nieuwe antilichamen zullen worden getest in tumordragende muizen voor de mogelijkheid tot verbeteren van beeldvormende technieken. Muizen zullen worden geïnjecteerd met gelabeld (bijv. Zr<sup>2+</sup> voor PET, of bijv. gadolinium voor MRI) antilichaam, waarna beeldvorming (PET scan of MRI) zal volgen.

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

Een hoofddoel van dit project is het ontwikkelen van vaccins/antilichamen/nanobodies, tegen nieuwe targets in de tumorbloedvaten, voor therapie. Wanneer goede nieuwe therapeutica zijn ontwikkeld zullen



deze vervolgens worden getest in combinatie met andere behandelingsvormen. Een ander hoofddoel is het ontwikkelen van antilichamen en nanobodies voor imaging gericht op diagnostiek. Wanneer muizen effectief zijn gevaccineerd, kunnen daaruit antilichamen gemaakt worden door na opoffering miltcellen uit te nemen en te gebruiken voor hybridoma technologie. Op deze manier kunnen dus monoklonale antilichamen worden gemaakt. Wanneer in het serum van de muizen na 5 vaccinaties geen antilichamen tegen de target kunnen worden aangetoond dan is dit een 'no go' voor de tumorgroei proef voor deze target.

We hebben reeds een aantal antilichamen en nanobodies ontwikkeld die we kunnen testen in imaging en tumorgroei, dus dit onderdeel kan gedeeltelijk los worden gezien van de vaccinatie ontwikkeling. In dit onderdeel zullen tevens de nieuw verkregen monoklonale antilichamen worden getest.

De verschillende onderdelen zijn dus als volgt met elkaar verbonden:

1. Vaccinatie → testen veiligheid vaccin → monoklonale antilichaam maken → testen vaccins en antilichamen in tumorgroei → effect van vaccins op wondgenezing en fertiliteit.
2. Testen van optimale combinatie van small molecule inhibitors, genaamd 'targeted therapy'
3. Testen van vaccins/monoclonale antilichamen/nanobodies in combinatie met (i) chemotherapie, (ii) targeted therapy (deze volgt uit 2.) of (iii) checkpointinhibitors.
4. Testen de geschiktheid van monoklonale antilichamen/nanobodies voor diagnostische beeldvorming.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	vaccinatie muis + maken monoclonaal antilichaam + tumorgroei
2	Targeted therapy muis
3	vaccins/MAbs/nanobodies in combinatie met andere therapieën
4	Imaging muis
5	
6	
7	
8	
9	
10	



# DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD **10.2 .e. en g** 2016576-3
  2. Titel van het project:  
*Angiostatische combinatietherapieën voor de behandeling van kanker*
  3. Titel van de NTS:  
*Angiostatische combinatietherapieën voor de behandeling van kanker*
  4. Type aanvraag:
    - nieuwe aanvraag projectvergunning
    - wijziging van vergunning met nummer AVD **10.2 .e. en g** 2016576
  5. Contactgegevens DEC:
    - naam DEC: **10.2 .e. en g**
    - telefoonnummer contactpersoon: **10.2 .e. en g**
    - mailadres contactpersoon: **10.2 .e. en g**
  6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
    - ontvangen door DEC: 04-10-2019
    - aanvraag compleet: 04-10-2019
    - in vergadering besproken: 08-10-2019
    - anderszins behandeld: *n.v.t.*
    - termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
    - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
    - aanpassing aanvraag: *n.v.t.*
    - advies aan CCD: 30-10-2019
  7. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
  8. Correspondentie met de aanvrager: 16-10-2019
- De documenten zijn naar aanleiding van de DEC vergadering op 8 okt aangepast op 16 okt waarbij de mannetjes vallen onder bedrijfsvoering (wijzigingsformulier en bijlage 1 zijn aangepast).*
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): *n.v.t.*

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)



1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een wijziging*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t. (geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project)*

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

### 1. Het project is:

- ✓ *uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord*
- *uit onderwijskundig oogpunt verantwoord*
- *uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord*
- *wettelijk vereist*

2. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën (fundamenteel en toegepast onderzoek) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

*Het doel van deze studie is de ontwikkeling van verbeterde anti-kanker therapieën en diagnostiek. Dit wordt gedaan door het ontwikkelen van vaccins, antilichamen en nanobodies tegen antigenen (targets) in de tumorbloedvaten. De nieuwe vaccins en antilichamen/nanobodies zullen getest worden als monotherapie, en na validatie ook in combinatie met (i) chemotherapie, (ii) targeted therapy en (iii) checkpointinhibitors. Daarnaast wordt getest of de nieuwe vaccins en antilichamen/nanobodies geschikt zijn voor imaging van de tumorbloedvaten.*

*Het uiteindelijke doel is nieuwe en betere therapieën ontwikkelen voor de behandeling van kanker en het beter monitoren van het effect van de behandelingen door middel van diagnostiek (imaging).*

10.2 .e. en g

*. Hoewel de vaccins zijn gericht tegen de tumorvasculatuur, zou een eventuele bijwerking van de vaccins kunnen zijn dat deze ook de normale bloedvaten van de gezonde organen aangrijpen. De vorming/aanmaak van nieuwe bloedvaten vanuit bestaande bloedvaten (angiogenese) is namelijk een centraal proces in de wondgenezing, de foetale/embryonale ontwikkeling en de menstruatiecyclus.*

10.2 .e. en g *te onderzoeken wat de effecten van de ontwikkelde vaccins zijn op wondgenezing en fertiliteit, waarin fysiologische angiogenese optreedt. Deze wijziging betreft experimenten als uitbreiding van het veiligheidsonderzoek zoals eerder opgenomen in de huidige CCD vergunning (zie ook de rode tekst in het DEC-advies en in de aangepaste documenten).*



#### Wondgenezingsproeven

In bijlage 3.4.4.1 'vaccinatie muis + maken monoklonaal antilichaam + testen tumorgroei' is het bestuderen van de veiligheid van het vaccin opgenomen. Voor het onderdeel veiligheid zijn 125 muizen C57BL/6 vergund, hiervan zijn 15 muizen gebruikt. Op dit onderdeel staan dus nog 110 muizen. Voor de wondgenezingsstudies zijn vrouwelijke 10 muizen per experiment nodig (target groep (n=5); controlegroep (n=5)). Binnen de huidige looptijd (2 jaar) van het project verwacht men nog 4 targets te kunnen testen, dus 40 muizen voor de wondgenezingsstudies worden gebruikt. Voor de experimenten zullen de muizen eerst worden gevaccineerd en wanneer deze hyperimmuun zijn, dus antilichamen tegen de target hebben aangemaakt, zal met behulp van een huidstans (biopsy punch) een wond (full-thickness wound/open wond) worden geplaatst op de rug van de muis onder inhalatie anesthesie. Tijdens de wondprocedure (het plaatsen van de wond) zal peri- en postoperatieve pijnstilling worden gegeven. Na het plaatsen van de wond zal de muis individueel worden gehuisvest, om te voorkomen dat de muizen aan elkaars wonden gaan zitten en daar door de wondgenezing wordt beïnvloed. Wanneer de wondgenezing het toelaat dan zullen de muizen weer in groepshuisvesting worden geplaatst. Het plaatsen en hebben van een open wond, inclusief het individueel huisvesten wordt ingeschat als matig ongerief voor de muis. Het ongerief voor de individuele muis neemt dus toe naar matig ongerief ten opzichte van het lichte ongerief zoals beschreven in de CCD vergunning voor het onderdeel veiligheid. Dit geldt voor 0.5% van de muizen in bijlage 3.4.4.1. De DEC is van opvatting dat de wondgenezingsproeven passen binnen de doelstelling van het project.

#### Fertiliteitsproeven

In bijlage 3.4.4.1 'vaccinatie muis + maken monoklonaal antilichaam + testen tumorgroei' is het bestuderen van de veiligheid van het vaccin opgenomen. Voor het onderdeel veiligheid zijn 125 muizen C57BL/6 vergund, hiervan zijn 15 muizen gebruikt. Voor de fertiliteitsstudies zijn 10 muizen per experiment nodig (target groep (n=5); controlegroep (n=5)). Binnen de huidige looptijd (2 jaar) van het project verwacht men nog 4 targets te kunnen testen, dus van de 110 vergunde muizen zullen 40 vrouwelijke muizen voor de fertiliteitsstudies worden gebruikt. Voor de fertiliteitsexperimenten zullen de vrouwelijke muizen eerst worden gevaccineerd en wanneer deze hyperimmuun zijn, dus antilichamen tegen de target hebben aangemaakt, zullen deze bij een niet gevaccineerd C57BL/6 mannetje worden geplaatst (deze mannetjes vallen onder fok bedrijfsvoering). Wanneer de vrouwtjes zwanger zijn worden ze individueel gehuisvest, maar ze zitten altijd in open kooien zodat ze elkaar kunnen horen en ruiken. Het individueel huisvesten van zwangere vrouwtjes is een gangbare procedure tijdens de fok. Ook kan op deze manier worden nagegaan van welke muis de pups afkomstig zijn, d.w.z. behandelgroep of controlegroep. Na de geboorte wordt het aantal pups geteld, wordt hun staartlengte gemeten en worden de pups gewogen. De pups zitten te allen tijde bij hun moeder en worden dus niet individueel geplaatst. Aan het einde van de proef zullen de vrouwtjes en de pups worden afgemaakt en het bloed en de organen van de vrouwelijke muizen en de volledige pups zullen worden bewaard voor verder onderzoek. Het aantal pups per vrouwelijke muis wordt geschat op 10 pups per muis. Voor deze proeven wordt het totale aantal pups dus geschat op 400. Voor onderdeel 1 (bijlage 3.4.4.1) zijn 7840 muizen vergund en in totaal zijn er pas 175 muizen voor dit onderdeel gebruikt. Van de resterende 7665 muizen zullen er 400 worden gebruikt als pups. In voorgaande studies is geen effect op het lichaamsgewicht en de algehele conditie (welzijn) van de muizen waargenomen. Op grond van deze bevindingen verwachten we dan ook geen effect van de vaccinatie op de



foetale/embryonale ontwikkeling. Om echter te voorkomen dat we een verkeerde inschatting maken van het mogelijke ongerief hanteren we voor de fertiliteitsproeven maximaal matig ongerief. Het ongerief voor de individuele muis neemt dus toe naar matig ongerief ten opzichte van het lichte ongerief zoals beschreven in de CCD vergunning voor het onderdeel veiligheid. Dit geldt voor 5.9% van de muizen vergund in bijlage 3.4.4.1. De DEC is van opvatting dat de wondgenezingsproeven passen binnen de doelstelling van het project.

3. De DEC onderschrijft het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling, te weten:

*Het wetenschappelijk belang: Het ontwikkelen van anti-kanker therapieën en het testen daarvan in muismodellen zal leiden tot een verbeterd inzicht in hoe tumorbloedvaten een target kunnen zijn voor de behandeling van kanker. Tevens zal de studie het inzicht verschaffen in de biologie van (tumor)endothelcellen en het proces van angiogenese (nieuwvorming van bloedvaten) in tumoren.*

*Het maatschappelijk belang: Vooralsnog zijn er voor een groot deel van de kankerpatiënten (met uitzaaingen) weinig mogelijkheden voor therapie. Het belang van dit onderzoek is het ontwikkelen van verbeterde anti-kanker therapieën met minder bijwerkingen en een betere diagnostiek dan bestaande therapieën en diagnostische mogelijkheden. Hierdoor kunnen patiënten beter en gericht behandeld worden en zal de kwaliteit van leven worden verbeterd.*

*De DEC is van mening dat het maatschappelijk belang substantieel is en het wetenschappelijke belang reëel.*

4. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

*Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden. Binnen de onderzoeksgroep is zowel voldoende deskundigheid als financiering aanwezig om het project succesvol uit te voeren. Voor de meeste van de voorgestelde experimenten zijn subsidies verkregen (Koningin Wilhelmina Fonds, Europese Commissie). Ervaring binnen het 10.2.e. en g met vergelijkbare experimenten waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er voor enkele gespecialiseerde experimenten nauw samengewerkt met andere onderzoeksgroepen.*

*De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project nieuwe anti-kanker therapieën zullen worden ontwikkeld. De nieuw verkregen therapieën kunnen op termijn leiden tot betere en gerichtere behandeling van kankerpatiënten. Ook onderschrijft de DEC dat het project de diagnostiek zal kunnen verbeteren.*

*De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de beschrijving van de verschillende doelstellingen en type dierproeven benoemd in de aanvraag. De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC een toetsbare eenheid. In de beschreven strategie zijn een aantal heldere go/no go beslismomenten geformuleerd.*

5. Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende



*huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. Voor deze wijziging zullen vrouwelijke dieren worden gebruikt.*

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

*Het verwachte ongerief is licht tot matig. Licht ongerief zal optreden als gevolg van injecties (onderhuids), scheren en tumorgroemetingen. Ook het ongerief als gevolg van de tumorgroei wordt geschat op licht. Matig ongerief wordt verwacht als gevolg van de behandeling met antilichamen en chemotherapie (injecties via de buikholte), door operaties en bloedafname. Bij elkaar opgeteld zal een percentage van 6.4% van het totale aantal vergunde muizen in bijlage 3.4.4.1 matig ongerief ondergaan door te worden gebruikt voor de wondgenezings- en fertiliteitsproeven.*

*Ernstig ongerief wordt niet verwacht. De criteria conform de "code of practice dierproeven in het kankeronderzoek" (Den Haag/Zutphen, juli 1999) zullen worden gehanteerd. Wanneer er meer dan matig ongerief optreedt dan wordt het experiment beëindigd en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd.*

7. *Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de **vervanging** van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.*

*De reactie van het afweersysteem en hoe het vaccin/antilichaam de tumorgroei en tumorbloedvat vorming beïnvloedt is een complex systeem. Tot op heden is er geen volwaardig alternatief voor proefdieren om deze informatie te verkrijgen en daarom is het gebruik van proefdieren onvermijdelijk. Er wordt pas in muizen getest na een uitgebreide validatie van de targets in in vitro bioassays (proeven met cellijnen), waarbij de meest geschikte targets worden getest in dieren.*

*De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Wereldwijd wordt de muis gebruikt voor kankeronderzoek, dit heeft als voordeel dat proeven onderling vergeleken kunnen worden en dat ervaring kan worden gedeeld.*

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

*Door gebruik te maken van in vitro validatie van targets, het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.*

*Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 10864 muizen, en acht dit aantal realistisch onderbouwd.*

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



De richtlijnen conform de "code of practice dierproeven in het kankeronderzoek" (Den Haag/Zutphen, juli 1999) zullen worden gevolgd. Om het ongerief te minimaliseren worden alle handelingen door ervaren/bekwame onderzoekers en diervverzorgers uitgevoerd en waar mogelijk wordt pijnstilling of verdoving toegepast. Mochten er onvoorziene complicaties optreden die meer dan matig ongerief veroorzaken dan wordt op basis van de geformuleerde humane eindpunten het experiment onmiddellijk beëindigd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

## **D. Ethische afweging**

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project en de wijziging het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is het ontwikkelen van verbeterde anti-kanker therapieën en diagnostiek.

Het verwachte resultaat, in het kader van de betere en gerichtere behandeling van kanker, is afgewogen tegen het, maximaal als matig geschatte ongerief, de aantasting van de integriteit en het doden van de dieren in de proef.

Ook het verwachte resultaat van de wijziging, met als doel de effecten van de ontwikkelde vaccins op wondgenezing en fertiliteit te onderzoeken, is afgewogen tegen het matige ongerief, de aantasting van de integriteit en het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 10864 muizen en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd.

Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel maatschappelijk belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het maatschappelijke belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten kunnen op termijn leiden tot verbeterde anti-kanker therapieën en diagnostiek voor kankerpatiënten. Het wetenschappelijke belang wordt ingeschat als reëel. Er zal door het onderzoek meer inzicht komen in hoe tumorbloedvaten een target kunnen zijn voor de behandeling van kanker.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn wordt behaald. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijke



*belang en het reële wetenschappelijke belang van het onderzoek (en de wijziging) naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 10864 muizen en het daarbij verwachte maximale matige ongerief.*

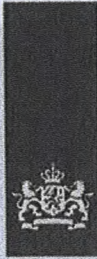
## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- ✓ *De DEC adviseert de wijziging bij deze vergunning te verlenen*

### 2. *Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.*





## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2 .e. en g

### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

### Onze referentie

Aanvraagnummer  
AVD10.2 .e. en g 2016576-4

Datum 12 november 2019

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 2 oktober 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Angiostatische combinatietherapieën voor de behandeling van kanker" met aanvraagnummer AVD10.2 .e. en g 2016576, waarvoor op 10 augustus 2016 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AV10.2 .e. en g 2016576-4. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u wondgenezigsexperimenten en fertiliteitsexperimenten toe te voegen aan het project.

### Beslissing

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Angiostatische combinatietherapieën voor de behandeling van kanker" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

### Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC10.2 .e. en g (hierna: de DEC). Dit advies is opgesteld op 30 oktober 2019. 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 DEC. Wij nemen dit advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

### Overwegingen

Op grond van de bovenstaande stukken zijn wij van mening dat de toe voegen dierproeven toelaatbare wijzigingen betreffen van het project, waarvoor op 10 augustus 2016 een vergunning is verleend.



De CCD is van mening dat het verwachte resultaat van de wijziging, met als doel de effecten van de ontwikkelde vaccins op wondgenezing en fertiliteit te onderzoeken, op weegt tegen het matige ongerief, de aantasting van de integriteit en het doden van de dieren in de proef.

**Datum**

12 november 2019

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD102242016576-4

**Vergunning**

Uw vergunning wijzigt als volgt (wijzigingen cursief gedrukt):

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 vaccinatie muis + maken monoklonaal antilichaam + testen tumorgroei	Muizen	7840	87,5% Licht, 12,5% matig 5% licht, 95% matig

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.  
U dient deze brief toe te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

**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 93118, 2509 AC, 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 gegevens in het colofon.

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

Drs. F. Braunstah

10.2 .e. en g





2015226-3

# 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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'. 11500 AVD115002015226

1.2 Provide the name of the licenced establishment. UMC Utrecht

1.3 Provide the title of the project. In vivo validation of novel dialysis techniques

## 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 animal health or welfare
  - 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.

#### **Problem**

Patients with end stage kidney disease (ESKD) undergo dialysis (hemodialysis or peritoneal dialysis (PD)) to replace kidney function. Worldwide the number of dialysis patients is estimated at 2.5 million. Prevalence is growing (~7-8% annually) due to an ageing population and increased prevalence of diabetes and hypertension, which are the key risk factors for chronic kidney disease. Although life-saving, conventional dialysis has major shortcomings. The treatment is time-consuming (conventional in-center hemodialysis: thrice weekly 4 hours) and removal of waste molecules and excess water is inadequate, contributing significantly to poor life quality, severe health problems and high mortality (15-20% per year). Treatment costs are very high placing a heavy burden on the health care system of developed countries while access to dialysis treatment is often severely limited in developing countries due to lack of financial and clinical resources.

#### **The proposed solution**

To improve dialysis treatment the following innovations are proposed:

1. Development of novel dialysis membranes and filtration techniques
2. Development of a miniature dialysis device (MDD)

#### *1. Development of novel dialysis membranes and filtration techniques*

Small (<0.5 kDa) water-soluble waste molecules diffuse easily through the pores of a dialysis membrane. On the contrary, removal of fat-soluble protein-bound molecules and larger molecules (0.5-60kDa), the so-called middle molecules, is insufficient with conventional filtration techniques (Dhondt, Kidney Int, 2000:58: S47-S59). Accumulation of protein-bound molecules and middle molecules contributes to adverse outcome in dialysis patients, in particular to high cardiovascular morbidity. Novel membrane and filtration techniques, such as mixed matrix membranes, combining dialysis and adsorption in one step, and middle (dia)filtration techniques, have been shown to significantly improve removal of these 'difficult to remove' uremic toxins (in vitro) (Tjink, Biomaterials, 2013:34: 7819-28; Van Geffen, Abstract ERA-EDTA Congress, 2015; Krieter, Nephrol Dial Transplant, 2005:20:155-60) and may thereby considerably improve patient outcome.

#### *2. Development of a miniature dialysis device*

Realization of a miniature dialysis device will be a major breakthrough in renal replacement therapy with major medical and economic impact worldwide. It will offer improved blood purification outside the hospital at a lower price. By increasing dialysis time and use of innovative cleansing methods more efficient and gradual removal of uremic toxins and excess fluid is anticipated, which will improve patient's health condition and reduce medical complications. The miniaturized design, independent of a fixed water supply or large supply of dialysis fluids, is a great contrast to conventional dialysis machines (≥60L dialysate per



treatment) and will offer more freedom and autonomy to the patients allowing them to stay active in social and economic life. In recent years, a prototype miniature dialysis device has been constructed by the UMCU in collaboration with private partners and international institutes and efficacy and safety have been established in vitro (10.2.e.eng)

#### **In vivo validation of efficacy and safety**

A very important next step towards application of the novel dialysis techniques in patients is the in vivo testing in animal models. Prior to the in vivo experiments, extensive in vitro testing with the novel dialysis techniques has been (or will be) performed to validate efficacy and safety of the technique in vitro, which includes 1) establishment of adequate toxin removal by using recirculating uremic plasma, 2) in vitro hemocompatibility testing, 3) in vitro cytotoxicity testing (by exposing cells to 'novel-dialysis-technique-treated' fluids) and 4) analysis of degradation products and leachables. However, the in vitro situation profoundly differs from that in vivo. For proper evaluation of in vivo performance, efficacy and safety, in vivo testing will be inevitable. So (only) in case of a positive in vitro safety and efficacy assessment we will proceed to in vivo (animal) testing. In vivo technical performance (e.g. sensor accuracy and alarm performance), in vivo efficacy (e.g. toxin clearance) and (short term) safety (e.g. hemocompatibility, effects on electrolyte balance and acid/base status) will be assessed in a large animal model. In first instance goats will be used, because these animals have distribution volumes comparable to humans (body weight of 50-100 kg) allowing extrapolation to humans. In addition, since dialysis is a chronic treatment, evaluation of long-term systemic toxicity will be required (according to ISO 10993: 'Biological evaluation of medical devices') to assess the potential of the novel dialysis treatment to cause adverse systemic reactions after repeated exposure for a considerable part of the life span. As recommended by ISO 10993 we will use a rodent model and will continue the exposure for >10% of the life span of the animals. Chronic kidney failure will be induced to improve extrapolation to end stage kidney disease patients. We expect that this model will provide useful information, relevant for human health, on accumulation of harmful compounds and organ/ tissue/ systemic toxicity from repeated exposure.

The in vivo test results form a key component in the risk-management of the novel dialysis techniques. Verification of performance, efficacy and safety in animal trials is required to allow approval for use in clinical trials and is also a prerequisite for CE certification and, finally, market entry of the novel dialysis techniques.

The decision to continue exploring the novel techniques in a clinical trial will be taken after completion of the in vivo testing. (10.2.e.eng) will be closely involved in the process. The project plan for the in vivo testing is discussed with them and the findings will be documented in an investigational medical device dossier (IMDD). The MTKF will assess, at intervals, the progress of the testing. Based on the findings, MTKF will advise on whether the clinical trials can be carried out without unacceptable risk for subjects. In addition, an independent medical ethics committee (METC) will evaluate whether further testing in a clinical trial is justified taking into account the in vivo results and the advice of the MTKF.

#### **Uniqueness of the proposed project**

The project aims to validate efficacy and safety of novel dialysis membranes and filtration techniques in vivo. Also the miniature dialysis device is a completely novel therapeutic concept for dialysis.

The mixed matrix membranes combine dialysis and adsorption of toxins which, at present, has only been demonstrated and published by the (10.2.e.eng) The filtration techniques concern novel biomimetic microfluidic techniques, completely different from the plenum-style design of conventional membranes (no data published yet due to IP-related issues).

With regard to the miniature dialysis device: as far as we know there is one other research group working on a wearable artificial kidney (10.2.e.eng) They use a (relatively old) urease-based technology for dialysate regeneration which has significant disadvantages: requirement of a large amount of ion exchangers, need for postcardridge replenishment of electrolytes, risk of release of toxic ammonium and sodium and the cartridges are not regenerable. Our collaborative research group works on a regenerable system (based on (amongst others) electro-oxidation and sorbents for removal of urea and other toxins) that allows further miniaturization without the need for postcardridge replenishment and without the risk of release of toxic ammonium and sodium. As far as we know, we are the only group that is working on these new technologies for dialysate regeneration.

With regard of the in vivo testing: as far as we know, we are the only group in Europe that has established a large animal hemodialysis model (and is planning to develop a large animal uremic hemodialysis model).



### 3.2 Purpose

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

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

The main research objectives of the in vivo testing comprise:

- A. Verification of in vivo performance and efficacy in large animal models
  - Subgoal: development of a large animal uremic model
- B. Long-term systemic toxicity arising from chronic exposure to the novel dialysis technique

*Verification of in vivo performance and efficacy in large animal models*

Goal is to evaluate performance and efficacy of the novel dialysis technique and to gather information enabling proper definition of treatment schemes in the clinical trials. (Short term) safety will also be assessed. Note that complete biocompatibility assessment is performed in rodents (see below). A large animal model for hemodialysis in healthy animals is available. However, since kinetics of uremic toxins and metabolic and fluid balance differ profoundly in uremic animals as compared to healthy animals, a chronic kidney failure ('uremic') model will be developed.

*Testing for long-term systemic toxicity in rodents*

Since long-term testing is not feasible in a large animal model, in vivo testing for long-term systemic toxicity will be assessed in uremic rodents (according to ISO 10993 'Biological evaluation of medical devices') by evaluating the effects of chronic exposure to the novel dialysis technique. Exposure will be continued for 15 weeks (i.e. >10% of average life span in accordance with ISO 10993). This model will provide useful information, relevant for human health, on the potential risk of the novel dialysis technique to cause organ/ tissue/ systemic toxicity arising from repeated exposure for a considerable part of the life span.

### 3.3 Relevance

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

See 3.1 'Background: Problem'.

### 3.4 Research strategy

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

Prior to the in vivo experiments, the novel dialysis techniques have been (or will be) redesigned to meet the quality standards for medical devices necessary for approval of its use in the clinical trials. Extensive in vitro testing has been (or will be) performed to validate efficacy and safety of the technique in vitro, which includes 1) establishment of adequate toxin removal by using recirculating uremic plasma, 2) in vitro hemocompatibility testing, 3) in vitro cytotoxicity testing (by exposing cells to 'novel-dialysis-technique-treated' fluids) and 4) analysis of degradation products and leachables. **Only in case of a positive in vitro safety and efficacy assessment we will proceed to in vivo (animal) testing.**

In vivo validation of novel hemodialysis techniques will subsequently comprise (for the rationale behind the consecutive animal experiments, see 3.4.2):

- A. Verification of in vivo performance and efficacy in large animal models
  1. Dose-finding of uremic toxins
  2. Hemodialysis in healthy animals



3. Development of a large animal uremic model
  4. Hemodialysis and peritoneal dialysis in uremic animals
- B. Testing for long-term systemic toxicity in rodents
5. Chronic exposure to 'novel-dialysis-technique' treated dialysate

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.

**A. Verification of in vivo performance and efficacy in large animal models**

*1+2. Dose-finding of uremic toxins and hemodialysis in healthy animals*

For the testing of the novel hemodialysis techniques we will start using a currently available model: hemodialysis in goats. We selected goats, because these animals are docile (can be trained for undergoing hemodialysis at the operation room), have readily accessible veins and have body weights (70-90 kgs) and distribution volumes that are comparable to humans. We have ample experience with hemodialysis in healthy goats. To limit the number of animals required for the in vivo efficacy validation, we will, in first instance, use healthy animals. Since the animals are expected to remain healthy\*, we will be able to perform many dialysis experiments in the same animal over a long period of time, allowing optimization of the novel technique for the in vivo situation between the dialysis experiments. Uremic toxins, such as urea, creatinine, indoxyl sulfate and hippuric acid will be infused. Dosing will be aimed at achieving concentrations within the range of reported concentrations in dialysis patients. Prior to the dialysis experiments we will perform pharmacokinetic infusion experiments in goats (without applying the novel dialysis technique) to determine dosage for the dialysis experiments and exclude adverse effects of the infusion (1a). Since we aim for concentrations within the range of reported concentrations in dialysis patients the likelihood of occurrence of acute adverse effects is very low. However, if we observe significant acute adverse effects we will not continue with the infusion which will presumably result in fast resolution of the symptoms (all relevant toxins are renally cleared and thus rapidly removed from the body by the healthy kidneys). Subsequently, hemodialysis experiments will be performed with the novel dialysis technique and results will be compared with those obtained during conventional hemodialysis treatment (1b). For assessment of efficacy we will determine the extraction of the uremic toxins by the novel dialysis technique at regular intervals by simultaneous sampling of the arterial and venous line of the blood circuit. Total toxin removal will be estimated. Performance of the novel dialysis technique will be assessed. (Short term) safety will also be evaluated and will include hemodynamic, respiratory and metabolic monitoring, assessment of animal comfort and testing for hemolysis and electrical safety (if applicable). Effluent of the novel dialysis technique will be cultured to confirm sterility.

\*Note: In previous infusion experiments we did not observe persistent adverse effects of infusion of uremic toxins and after 2 years of dialysis experiments goats could be discharged to a farm.

*3. Development of a large animal uremic model*

After evaluation and optimization of performance and efficacy in healthy animals, a series of experiments will be required with the final prototype in a limited number of animals with chronic kidney failure ('uremia'), since kinetics and metabolic and fluid balance profoundly differ in uremic animals as compared to healthy subjects. Since no uremic model in large animals is available in the Netherlands, the model has to be developed. Goal is the establishment of a chronic kidney failure model that results in a stable uremic milieu without the need for daily hemodialysis. In first instance goats will be used because we have very good experience with hemodialysis in (healthy) goats. However, the induction of kidney failure carries a risk in this species: goats are ruminants and are susceptible to bloat, an overdistention of the reticulorumen (the first two stomachs chambers) with gases of fermentation, which is associated with a high mortality. This may occur after the induction of kidney failure due to discomfort leading to anorexia, which causes bacterial imbalance/ dysbacteriosis in the reticulorumen. If bloat occurs in the goats, we will consider switching to pigs, which are omnivores that have no risk of this phenomenon. In first instance, bilateral subtotal renal embolization will be applied to create the remnant kidney model. Embolization is minimally invasive (does not require an open surgical procedure) and is therefore expected to result in a shorter recovery time, less morbidity and less postprocedural complications than surgical nephrectomy. If not successful, e.g. due to animal discomfort or unsuccessful embolization, we will move over to surgical nephrectomy. After induction of chronic kidney failure, clinical condition will be closely monitored daily, including animal comfort, hydration status and body weight. Urea,



creatinine and potassium concentrations will be measured on alternate days. Depending on the results we will adjust the embolization (or surgical) procedure accordingly. After each two goats we will evaluate whether or not to proceed with induction of chronic kidney failure in goats or switch to pigs.

**4. Hemodialysis in uremic animals**

After successful establishment of a uremic model, we will proceed with hemodialysis experiments using the novel dialysis technique. Goal is to compare efficacy of the novel treatment with that of conventional hemodialysis. Primary endpoints are total toxin removal, toxin clearance and ultrafiltration. In addition, several safety parameters will be evaluated such as electrolyte balance, acid base status and hemolysis parameters. During the dialysis session blood will be drawn at regular intervals and urine will be collected to determine toxin removal and clearance by the novel dialysis technique (and the native kidneys). Blood pressure, body weight, temperature, respiratory status and animal comfort will be assessed. Effluent of the novel dialysis technique will be cultured.

**6. Peritoneal dialysis in uremic animals**

Uremic dogs will be used for testing of a dialysis device for peritoneal dialysis because peritoneal transport status (i.e. mass transport of uremic toxins from the blood into the intraperitoneal compartment across the peritoneal membrane) of goats and pig is very low, much lower compared with humans, which precludes comparison of absolute removal and plasma clearance of toxins with conventional PD in humans. Demonstrating superior efficacy of the novel dialysis device compared with conventional PD is required to justify a first in human clinical trial. Uremic dogs (patients) **10.2.e. en g** ) will be used. These animals would normally have been treated with conventional PD or would have been euthanized. Thus, additional discomfort caused by study treatment is limited, and animals may benefit from treatment due to removal of excess water and uremic toxins. With this approach, the number of laboratory animals who need to undergo a procedure to establish uremia is reduced.

**B. Testing for long-term systemic toxicity in rodents**

**5. Chronic exposure to 'novel-dialysis-technique' treated dialysate**

Since long-term testing (>10% of life span according to ISO 10993) for chronic systemic toxicity is not feasible in a large animal model, in vivo biocompatibility will be assessed in subtotally (5/6) nephrectomized rats (Bongartz, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010:298:R815–R823). However, hemodialysis with the novel dialysis techniques is not feasible in rats. As surrogate, we will use a chronic peritoneal dialysis model. 'Novel-dialysis-technique-treated' dialysate will be administered intraperitoneally to the uremic rats each day after instrumenting them with a peritoneal catheter, connected to an implanted subcutaneous mini access port (Loureiro, PLoS One 2013;8:e61165). Since blood plasma equilibrates with the dialysate in the peritoneal cavity, we consider this as a reliable alternative for chronic hemodialysis where blood plasma equilibrates with dialysate across a semi-permeable dialysis membrane. Chronic treatment with dialysate derived from conventional dialysis will be used as control.

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.

See 3.4.2.

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	Dose-finding of uremic toxins
2	Hemodialysis in healthy goats
3	Development of a large animal uremic model
4	Hemodialysis in uremic animals



5	Chronic exposure to 'novel-dialysis-technique' treated dialysate
6	Peritoneal dialysis in a uremic dog model
7	
8	
9	
10	



**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : AVD115002015226
2. Titel van het project : In vivo validation of novel dialysis techniques
3. Titel van de NTS : Testen van nieuwe bloedzuiveringstechnieken om nierfalen te behandelen

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer : AVD115002015226-3

## 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 6. Adviestraject (data d-d-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 25-04-2019  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 15-05-2019  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 24-05-2019/27-05-2019  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 29-05-2019

## 7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 24-05-2019
- Datum antwoord: 27-05-2019
- Gestelde vragen en antwoorden:

## Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U houdt rekening met 50% uitval en berekent dat u 15 dieren nodig heeft. Maar bij een uitval van 50% heeft u 20 dieren nodig. Graag wijzigen.  
*Dank voor deze terechte opmerking. Het totale aantal dieren is gewijzigd in 20.*
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Daarnaast vraagt de DEC zich af waarop de uitval berust. Is dat omdat een dier niet voldoet aan de inclusiecriteria of omdat een dier tussentijds uitvalt? In dat geval strookt de uitval niet met de 5-10% dieren die het humane eindpunt bereiken. Graag nader toelichten.