

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202216495	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning				x		x		x	
2	Projectvoorstel bij aanvraag				x	x	x	x	x	
3	Bijlage dierproeven bij aanvraag				x				x	
4	NTS bij de aanvraag				x				x	
5	E-mail aan DEC om advies projectvergunning, d.d. 19-10-2022				x				x	
6	DEC-advies, d.d. 22-12-2022				x				x	
7	Projectvoorstel na DEC advies				x	x	x	x	x	
8	Bijlage dierproeven na DEC advies				x				x	
9	NTS na DEC advies			x						
10	AdviesNotaCCD, d.d. 27-12-2022 _met opmerkingen				x		x		x	x
11	AdviesNotaCCD, d.d. 28-12-2022				x		x		x	x
12	E-mail CCD aan vergunninghouder, vragen over aanvraag, d.d. 28-12-2022				x		x		x	
13	Reactie na CCD vragen				x	x	x		x	
14	Projectvoorstel na CCD vragen				x	x	x	x	x	
15	Bijlage dierproeven na CCD vragen				x					
16	NTS na CCD vragen			x						
17	E-mail CCD aan vergunninghouder, vragen over aanvraag, d.d. 09-01-2022				x		x		x	
18	Reactie na CCD vragen				x		x		x	
19	AdviesNotaCCD, d.d. 11-01-2023				x		x		x	x
20	NTS definitief		x							
21	Beschikking definitief, d.d. 09-01-2023				x		x		x	
22	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over aanvraag projectvergunning, d.d. 16-01-2023				x		x		x	



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, of in de toelichting op de website.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	5.1 lid2h
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1	
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2	
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel 5.1 lid2h Voorletters 5.1 lid2h Achternaam 5.1 lid2e <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2e
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	5.1 lid2h
		Postcode en plaats	
		Postbus, postcode en plaats	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	5.1 lid2h

	Telefoonnummer	5.1 lid2e
	E-mailadres	5.1 lid2e
1.5 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.6 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	5.1 lid2h
1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.8 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1 Gaat uw aanvraag over een wijziging op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2 Gaat uw aanvraag over een melding op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum 01 - 01 - 2023 Einddatum (t/m) 31 - 12 - 2028
3.2 Wat is de titel van het project?	Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model.
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	De zebravis als model voor ontdekking van nieuwe behandelingen tegen kanker
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC 5.1 lid2h Postadres

E-mailadres	5.1 lid2h
-------------	-----------

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.	Naam:	Afdeling:	
	Straat:		Huisnummer:
	Postcode:	Plaats:	
	Postbus:	Postcode:	Plaats:
	E-mail:		
4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.	Ordernummer:		

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht	
	<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel	Aantal bijlage(n) dierproeven
	<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting	
	Overige bijlagen, indien van toepassing	
	<input type="checkbox"/> Melding Machtiging	
<input type="checkbox"/>		

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)
- Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	5.1 lid2e
Functie	Gemandateerd vergunninghouder
Plaats	5.1 lid2h
Datum	- -
Handtekening	



Form

Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal
- 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 2.1.

Despite continuous effort cancer mortality remains 8.2 million per year worldwide. This number accounts for almost 15% of worldwide deaths (1). Although mortality rates are decreasing, cancer incidences are expected to raise in the next two decades what underlines the necessity for more effective anti-cancer

strategies. There is a clear need to develop more sophisticated bioassays and models that go beyond the *in vitro* use of classical cancer cell lines and *in vivo* mouse xeno-transplantation studies, and allow medium to high-throughput target discovery and drug lead identification. To this aim analyses within a complete organism are needed to grasp the full complexity of the interaction between treatment, cancer and host.

Zebrafish (*Danio rerio*) are increasingly used as a model organism to study cancer (2). Benefits include large clutch size, *ex utero* development and easy manipulability of larvae (3). There is high conservation of oncogenes and tumor-suppressor genes between zebrafish and human therefore data collected in zebrafish are relevant for humans (4). The histology of zebrafish tumors has been shown to be highly similar to tumors found in human cancers (5). The adaptive immune system in zebrafish does not reach maturity until 4 weeks post-fertilization (6), allowing circumvention of cell graft-host rejection by using zebrafish in early stages.

Zebrafish (ZF) larvae can absorb various small molecular weight compounds from water, which is advantageous when screening for anti-cancer compounds (7). In addition, drugs can be administered in dissolved or nanocarrier-encapsulated form by injection into the blood (IV) or behind the eye (8-10). Recently we have shown that ZF cancer models are suitable to test delivery modalities and efficacy of light activated drugs (10-11). Zebrafish experiments require much less material than in the mouse model to assess drug efficacy. Routinely we inject 200-500 cancer cells per larvae and use 1 ml of drug solution for 6 individuals once administered from egg water by immersion. Alternatively we inject 1-2nl of dissolved or nanoparticles-containing drugs (9-11). The experimental costs are low and procedures are simple and fast. The use of zebrafish in drug discovery in a time- and cost- effective manner initiated many clinical trials during the last two decades (7). For melanoma, a presently on-going phase II/III clinical trial of leflunomide combined with vemurafenib is the first to arise from initial screens in zebrafish.

Harnessing of transgenic lines with fluorescent vasculature, neutrophil granulocytes or macrophages, allows live, non-invasive imaging of proliferation, migration and tumor-associated neo-angiogenesis and interaction with microenvironment at the single cell resolution in the contacts of the entire organism within 1 week (12-13).

Using previously approved animal licences (5.1 lid2h) our group established many zebrafish xenograft models to study human cancers in zebrafish larvae and is on the forefront of zebrafish research in fields of cancer biology and immunity (Figure 1). We were among the first to generate, quantify and validate larval zebrafish cancer models for target and drug discovery (18-33). We successfully coordinated the (5.1 lid2h)

. Several key publications and participation in many international (5.1 lid2h) and national (5.1 lid2h)

) medical grants demonstrated that the zebrafish is an excellent model system for this purpose as xenotransplantation with human carcinoma cells is possible and cancer cell migration, proliferation, angiogenesis, micro-metastasis and immune response can be monitored *in vivo* within the developing tumor (9-11, 14-33, selected publications).

We found that the (5.1 lid2h)

[REDACTED]

5.1 lid2h

5.1 lid1c

All previously published results provided robust evidence that pharmacokinetics per se is not a cross-species barrier for ZF-PDXs (3, 31, 34, 35). First clinical trials using ZF-PDX system are initiated in the USA and many are in pipeline in Europe. Importantly, olaparib plus temozolamide treatment tested in zebrafish adult PDX and xenograft models of rhabdosarcoma, without additional model prerequisites, is in phase I of clinical trial (3, 7, 35).

5.1 lid1c

5.1 lid2h

to perform a high-throughput screen of drugs on primary biopsy materials as well patient derived organoids (31, 32 and Figure 2).

To conclude, in past years we successfully established ZF-xenograft models to study cancer pathogenesis, metastases mechanism and treatment. Importantly we have proven translational value of this model for clinical applications. This new follow-up project will be continuation of our research line developed in previous projects (5.1 lid2h).

In this new project we will engraft into zebrafish immortalized cancer cell lines as well primary cells derived from patient cancers to screen for drug targets and test the personalized drug response under conditions that may mimic *in vivo* environment.

Although zebrafish xenograft model has many advantages it still involves the use of animals and we will elaborate in this 5 year project proposal on the strategy to use as few animals as possible to reach our goals.

1. Globocan 2012 http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
2. Liu S, Leach SD. Zebrafish models for cancer. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 71-93.
3. Fazio M, et al. Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20: 263-273; doi: 10.1038/s41568-020-0252-3.
4. Howe K, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013; 496: 498-503;doi: 10.1038/nature12111
5. Amatruda JF, Shepard JL, Stern HM, et al. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer cell* 2002; 1: 229-231.

6. Lam SH, Chua HL, Gong Z, et al. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev Comp Immunol* 2004; 28: 9-28.

7. Patton EE, Zon LI, Langenau DM. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nature reviews. Drug discovery*. 2021; 20:611-628; DOI:10.1038/S41573-021-00210-8.

8. Sieber S, et al. Zebrafish as a preclinical in vivo screening model for nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2019; doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.001.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

12. Lawson ND, Weinstein BM. In vivo imaging of larval vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 2002; 248: 307-318.

13. Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DM, et al. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 2006; 108: 3976-3978.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

Ultimate aim of this project is: **discovery of genetic cancer targets and assessment of drugs for incurable solid cancers using zebrafish xenograft model.**

Immediate goals of this project will concentrate on the fundamental mechanisms controlling invasive cell migration, proliferation, tumor angiogenesis, metastatic initiation and interaction with host microenvironment **to predict targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies.** This will be achieved by: i) chemical inhibition of tumor phenotypes in engrafted larvae, ii) gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by LNP-Si-RNAs intravenous injection to block cancer or host genes responsible for cancer progression; iii) through inhibition of cancer phenotypes with selected antibodies, iv) transcriptomic, proteomics and metabolomics (Omics) analysis of cancer cells in culture versus cells forming experimental metastasis in the engrafted larvae. For this approach we will use immortalized cancer cells from zebrafish, mice and human origin as well patient-derived material directly from patients or after a propagation step in the organoids culture, or in mouse

patient derived xenografts (PDX). The cancer phenotypes (cell migration, angiogenesis, proliferation, metastatic onset, interaction with host microenvironment) induced by engraftment of fluorescent cancer cells will be microscopically examined and the relative tumor burden will be calculated by measuring the integrated fluorescent density in the fish at different days post injection (dpi) and normalized with respect to the burden at 1dpi.

The ZF-PDX strategy is also a powerful tool to predict aggressiveness of the primary human cancer cells and will be used for staging and assessment of prognostic value of the tumor cells derived from patients. This animal bio-imaging assay will serve as a first-line *in vivo* screening step in the anti-cancer drug discovery pipeline and optimization of drug administration modalities reaching the maximal efficacy without side-effects. In addition, the transcriptomic, proteomics and metabolomics analysis of cancer cells as well surrounding host stroma cells (e.g. macrophages) forming experimental metastasis in the engrafted larvae will lead to the identification of novel therapeutic targets for anti-cancer treatment. Selected targets will be initially validated by gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by LNPs-Si-RNA injection to block cancer or host genes responsible for cancer progression. The stringently selected, promising candidates will be further validated by engraftment of human cancer cells into the adult immunocompromised zebrafish to eliminate possible developmental artefacts induced by engraftment of human cancer cells into the zebrafish larvae (Group IV, see appendix). Final validation will be performed by our collaborators in the mouse pre-clinical models.

We believe that our immediate goals to achieve the ultimate goal are achievable because we have already established many models for incurable cancer types which will be used for basic and therapy-focus research in this project.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

All expertise, technology, chemical libraries and biological material, obtained from commercial sources or our medical collaborators justified by the material transfer agreements between different institutions are in place to conduct this project.

We have a strong clinical network of national (5.1 lid1c) and international (5.1 lid1c) collaborators with whom we will work together to utilize the full potential of zebrafish cancer models for translational research.

Many molecular and cellular components involved in tumorigenicity are highly conserved between zebrafish and human making this platform clinically relevant for translational, pre-clinical research towards personalized medicine. Successful integration of the zebrafish platform into preclinical anticancer drug target discovery and lead compound selection will reduce usage of rodents, time and costs.

Our institute is a well-known center of expertise for zebrafish cancer biology. (5.1 lid2h)

(5.1 lid2h). For example, to study the dynamic and reciprocal interactions between tumor cells and their host microenvironment we established a xenograft model by (5.1 lid2h)

(5.1 lid2h). This resulted in rapid formation of an experimental micro-metastasis, allowing time-resolved imaging of this process at single-cell level within one week (Figure 1).

5.1 lid2f

5.1 lid2f

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

Cancer continues to pose a major therapeutic challenge, as for some solid cancers, the prospects of cure remains remote, whilst their incidence stays high. A predominant challenge in developing curative cancer treatment is the co-evolution of tumor with its microenvironment. This project will provide more **scientific** insight into the mechanism of cancer development and its host microenvironment interactions to predict targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies.

Novel molecular signatures representing cancer aggressive drivers will be identified and attenuated by chemical or genetic intervention. In addition, development of the patient derived xenotransplantation models in zebrafish will allow testing of the personalized drug response in a time- and cost- effective manner with unprecedented **social** relevance.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

The research activities performed within the project will lead to new scientific knowledge and insights on the mechanisms of tumor development and *in vivo* efficacy of the new anti-cancer treatments. 5.1 lid2h

5.1 lid2h involved researches and students will benefit from knowledge generated in the immediate goals of this project. This innovative research with scientific and medical relevance will embark them with the experimental and theoretical knowledge to boost their future careers and job chances. Proposed project will lead to discovery of genetic cancer targets and assessment of drugs efficacy using patient material therefore in long terms patient will be the most important stakeholders. Success of this project should also attract interest of biotech companies to promote the utilization of obtained knowledge, model applications and therapy implementation towards the clinic. Importantly, the zebrafish are stakeholders because they are bred, used in procedures and killed under strict conditions using state-of-the-art facilities for this project. Their interest is that the that discomfort and the animal numbers are reduced to a minimum.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

Our overall strategy is to use the zebrafish xenograft model to study the fundamental mechanisms controlling cancer cell migration, heterogeneity, biology of metastatic initiation and interaction with host microenvironment to predict targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies with potential clinical application. For this purpose, we will use the overall design of the project illustrated in the schematic overview of overall approach (Figure 2) which composes of five different steps:

- 1) **engraftment** of the immortalized cells isolated from mice, zebrafish, human cancers and primary cancer cells directly derived from patients or after PDX propagation in mice or in organoids culture into zebrafish wild type, fluorescent reporter or mutant larvae or juvenile fish;
- 2) **treatment/intervention:** a) chemical inhibition of tumor growth in engrafted larvae will be performed by absorption of various small molecular weight compounds from growth medium or by IV injection of dissolved or nanoparticles-encapsulated drugs; b) genetic inhibition will be conducted by gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by LNP-Si-RNAs IV injection to block cancer or host genes responsible for cancer progression; c) through immunotherapy with selected antibodies;
- 3) **data acquisition** by direct fluorescent imaging of tumor progression and histological examination with cancer markers and identification of novel molecular signatures by the transcriptomic, proteomics and metabolomics (Omics) analysis of cancer cells in culture versus cells forming experimental metastasis in the engrafted larvae;
- 4) promising **candidate gene targets and drugs** will be selected based on their efficacy on metastatic dissemination, angiogenesis and metastatic onset in zebrafish larvae until 8 dpf (Group I and II);
- 5) **validation of prioritized candidate gene targets and drugs** by engraftment of selected human cancer cells into older larvae and sporadically into immunocompromised juvenile zebrafish for examination of their anti-tumor effects (as described in step 2) on more progressed tumors (metastatic) in the contacts of fully developed organs in older larvae and juvenile (Group III and IV).

In the first step: **engraftment**, fluorescently labeled cancer cells derived from mice, zebrafish and human cancers will be injected into the perivitelline space, blood circulation, behind the eye or brain cavity of 2 days old anaesthetized zebrafish larvae (wild-type, larvae with mutation in cancer related pathways, or larvae with fluorescent markers for different tissues) to microscopically monitor cancer cell migration, proliferation, angiogenesis and interaction with host stroma cells. To this aim cancer cells for

example in red will be engrafted into larvae with green vessels and blue immune cells and metastatic behavior will be assessed by a non-invasive bio-imaging platform already developed in our group. In this pilot study (Group I: 5-6 dpf) optimal injection site and cell lines, which survive in the larvae will be prioritized for further investigation (GO/NO GO decision). In order to monitor and eventually inhibit the crucial cancer phenotypes as cancer angiogenesis, interaction with host microenvironment (vessels, stroma and immune cells of zebrafish) and micro-metastasis formation we will extend duration of the experiment until 6 or 8 days post fertilization (dpf) without feeding of the larvae (group II). For promising candidate gene targets and drugs, selected based on their efficacy on metastatic dissemination, angiogenesis and metastatic onset in zebrafish larvae until 8 dpf (Group II: 7-8 dpf) after GO/NO GO decision experiments will be followed for additional 7 days to prove their effect on more progressed, metastatic tumors (group III: 9-15 dpf) and finally validated in juvenile with developed organs to prove that results obtained in the larval stages are relevant for adult animals (Group IV: up to 63 dpf).

After establishment of the engraftment conditions (injection site, cell line, drug concentration) up to day 5, the engrafted larvae will be subjected to different **treatments**. To inhibit metastatic onset engrafted and control larvae will be divided in 24 well plates (6 larvae per well) and exposed to selected concentration of drugs by adding them into the medium one day post implantation and refreshed every second day. Dissolved drugs or encapsulated in nanoparticles will be tested by retro-orbital or IV injection of 1-2 nl into 4 dpf anaesthetized larvae. Genetic inhibition of metastasis will be conducted by gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by IV injection of 1-2 nl of LNP-Si-RNAs into 4 dpf anaesthetized larvae to block cancer or host genes responsible for cancer progression. For immunotherapeutic tests cells will be mixed with antibodies prior the implantation or antibodies will be injected into the circulation one day post engraftment of cancer cells. To inhibit already formed tumors the antibodies and drugs will be directly injected into the tumor or circulation approximately at 9-15 dpf. The control group will be injected with the solvent at the same time point. The microscopic **data acquisition** will be conducted in anaesthetized larvae. The **candidate gene targets and drugs** will be prioritized based on the therapeutic efficacy quantified by microscopy, histology and Omics (transcriptomics, proteomics, metabolomics) approaches. The micro-metastatic cancer cells will be re-isolated from anaesthetized larvae for cancer cell heterogeneity studies in serial transplantation approach. Selected drugs will be further refined and therapeutic efficacy will be validated. For **validation** selected control cancer cells and cells with the candidate genes genetically modified by RNA interference will be injected into 2 dpf larvae (wild-type, larvae with mutation in cancer related pathways, or larvae with fluorescent markers for different tissues) and exposed to prioritized drugs as previously described. **Discovery of new gene targets and drugs** will be evaluated in near-patient in vivo mice models by our collaborators outside of this project.

The different steps of the project form an integrated platform for preclinical anticancer drug target discovery and lead compound selection. The different steps of the projects form a coherent procedure required to achieve our milestones:

1. Number and characterization of ZF-xenotransplantation models established.
2. Re-isolation of cancer cells from metastasis for transcriptomics, proteomics, metabolomics optimized
3. Inhibition of metastatic onset through chemical inhibition achieved: candidate drugs discovered
4. Inhibition of metastatic onset through genetic interference achieved: candidate gene targets discovered
5. Inhibition of metastatic onset through immunotherapy achieved: candidate antibodies selected

For this project

1. We aim for 8 cell lines inducing reproducible cancer phenotypes in larvae (cell proliferation, angiogenic switch, invasion, interaction with immune cells of the host) selected for validation in older larvae (Group II: 5-6 dpf).
2. We aim to test 10 inhibitors, 20 shRNAs and 5 antibodies selected based on their potential to inhibit one of the cancer phenotypes induced by engrafted cells at 6 dpf (Group I) selected for validation in older larvae (Group II: 5-6 dpf).

The above will then, based on our scientific estimation and experience, lead to the following Go's

3. We estimate to test 4 cell lines, 12 inhibitors and 2 antibodies prioritized for anti-metastatic treatment in older larvae with more advanced tumors (Group III: 9-15 dpf).
4. We estimate 4 cell lines and 6 inhibitors selected for validation of anti-metastatic efficacy in a juvenile (non-larvae) model with fully developed organs (Group IV: up to 63 dpf).

See also figure 2 (below) for a more overall schematic design of the project.

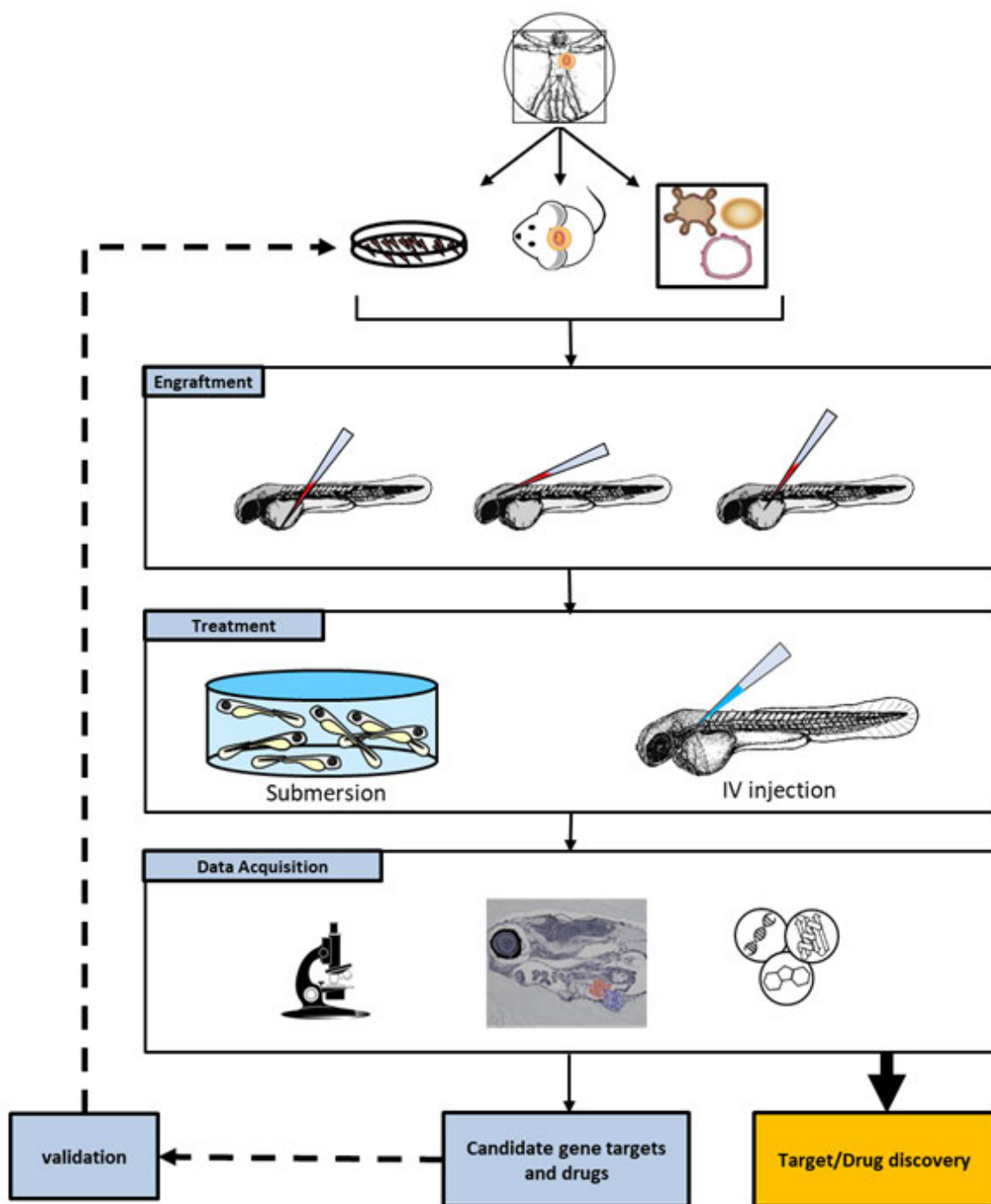


Figure 2. Translational cancer research in the zebrafish pipeline. Cancer cells from different origin (cell line, patient derived xenograft or organoid) are fluorescently labeled and injected into the zebrafish larvae at different positions at 2 dpf. Engrafted larvae treatment includes the drug administration by submersion or by IV injection of dissolved or nanocarriers encapsulated drugs and LNP-Si-RNA or antibodies. Cancer phenotypes are monitored by fluorescent microscopy. In parallel samples are taken for histology and transcriptional analysis (or 'OMICS analysis). Candidates gene targets and drugs are selected and validated through different approaches in the zebrafish (shRNA against a drug target in the same cell line etc.) Prioritized targets will be subsequently selected for pre-clinical validation outside of this project.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Our project will only entail the experiments in zebrafish models and use minimal number of animals. All experiments will comply with internationally established principles of Replacement, Reduction and Refinement (**the international 3R principle**). To reduce number of animals and refine their discomfort we will integrate GO/NO GO decisions after each step of the project as indicated in the appendix. For example the selection of promising cell lines, optimization of engraftment procedure and initial toxicity test with drugs will be performed with larvae until 5 days post fertilization. We will select only promising xenograft models and drugs that can be tested without over toxicity. This pre-screen will allow selection of the optimal concentrations and delivery modality of drugs without toxic effects on the host and minimalized usage of laboratory animals (larvae >5dpf) for more advanced drug screens. The duration of the animal experiment will be minimized in order to obtained pre-clinical relevant results. 5.1 lid2h

. After a license for this project will be obtained, all experiments for ongoing projects will formally be executed under this new license.

Success of integration of ZF xenograft models into drug and target discovery pipeline will reduce time and costs and accelerate pre-clinical discovery of new cancer treatments.

3.4.3 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	Drug and target discovery in zebrafish xenografts (submergion, IV injection, imaging, euthanasia)
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
1	Drug and target discovery in zebrafish xenografts

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Our experimental procedure is to inject fluorescent cells isolated from mice, zebrafish and human cancers into zebrafish wild type, fluorescent reporter or mutant larvae to generate new knowledge on basic cancer biology, which we will use for the development of compound and target discovery with potential clinical application. This procedure consists of multiple steps forming a coherent pipeline for drug and target discovery. The cancer phenotypes (cell migration, angiogenesis, proliferation, metastatic onset, interaction with host microenvironment) induced by engraftment of fluorescent cancer cells are microscopically examined. The relative tumor burden induced by wild type or genetically or chemically treated cells will be calculated by measuring of the integrated fluorescent density in the fish at different days post injection (dpi) and normalized with respect to the burden at 1dpi. Suitable genetic targets will be blocked with antibodies or can be modulated through immune reactions to inhibit or abrogate cancer growth or spread. In addition, IHC, transcriptomics and proteomics analysis of engrafted cells after genetic and chemical interference will identify a new genetic drug targets.

5.1 lid2h

This imaging based screening platform in zebrafish can rapidly determine the efficacy of either chemical inhibitors or genetic modification in cancer cells in an *in vivo* system and have potentially high translational value for patients (7).

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

Approximately 200-500 fluorescent cells of different incurable cancers (glioblastoma, osteosarcoma, cutaneous and eye melanoma, breast, prostate, bladder, colon, lung and pancreatic cancers) are injected at 2 days after fertilization of the eggs into the yolk sac, the duct of Cuvier, the perivitelline space, the brain cavity or behind the eye of the larvae using glass needle. During this manipulation the larvae are anaesthetized and show minimal signs of discomfort. The animals are observed daily and malformed larvae are removed and euthanized. The same procedure is used when engrafting cells into specific mutant zebrafish lines or reporter zebrafish lines related to cancer specific signaling pathways or organs, respectively. For treatments: either drugs are added to the water of the fish or intravenously injected into circulation in free or nanocarrier encapsulated form one day post engraftment of cancer cells (the level of expected discomfort is mild). The cancer cells are genetically modified prior to engraftment. The larvae stabilized/fixed in agar are imaged every 1st 4th and 6th day after injection using a stereo fluorescent microscope. At the endpoint of the experiment the larvae are euthanized and used for either transcriptomics, IHC analysis or *ex vivo* propagation of tissue for subsequent re-enuftment (euthanasia, mild discomfort). When possible, the downstream analysis of the engrafted zebrafish will be combined (i.e. IHC or fluorescent cancer cell burden measurements and transcriptomics samples from the same group). For promising candidate gene targets and drugs, selected based on their efficacy on metastatic dissemination, angiogenesis and metastatic onset in zebrafish larvae until 8 days post fertilization (dpf) (Group I and II) after GO/NO GO decision experiments will be followed for additional 7 days to prove their effect on more progressed, metastatic tumors (Group III: 9-15 dpf) and finally validated in juvenile with developed organs to prove that results obtained in the larval stages are relevant for adult animals (Group IV: up to 63 dpf) as requested for preclinical translation.

For animal procedures we will subdivide the zebrafish in several age classes (**Group I: 5-6 dpf, Group II: 7-8 dpf, Group III: 9-15 dpf and Group IV: up to 63 dpf**).

The main body of the experimental procedures will be carried out on larvae of ages up to 5 days (no laboratory animals according to Directive 2010/63/EU for animals up to a maximum of 5 dpf). Based on the results obtained with the compounds or genetic interference strategies we will decide (GO/NO GO decisions) to validate anti-metastatic effects of treatments in the contacts of fully developed organs in older larvae and juvenile (Group III and IV). The expected numbers of fish are outlined below.

Group I: 5-6 dpf

Inhibition of metastasis:

Every experiment will be performed in triplicate. We will screen 20 inhibitors in dissolved or nanocarrier-encapsulated form (selected based on the *in vitro* inhibition of cell proliferation in different cancer cell lines) in the 18 most promising cell lines. We will need two groups per experiment (inhibitor and vehicle control). Due to the intrinsic biological variation (zebrafish are not inbred such as murine models) we have found based on the power analysis in the past that group sizes of 45-50 and minimal three biological cohorts (obtained from different parents) are required for statistically significant reduction of cancer cell burden upon treatment. Finally we compare statistical differences between averages of the three cohorts.

Chemical inhibition:

- 20 inhibitors * 2 groups * 18 cell lines * 50 larvae per group * 3 cohorts = **108.000 larvae**

Subsequently we will use RNA interference strategies in 8 sensitive cell lines either to validate previously determined genetic targets or as a means to validate drug targets.

Through shRNA interference:

This point functions as **GO/NO GO** decision and we will select the 8 most promising cell lines and test 40 shRNA's on them. Selection of candidate genes is based on their interference/knock down effect on cancer cell migration and proliferation *in vitro*. Every experiment will be performed in three biological cohorts.

- 40 shRNAs * 2 groups * 8 cell lines * 50 larvae per group * 3 cohorts per experiment = **96.000 larvae**

When genetic targets are suitable to be blocked with antibodies or can be modulated through immune reactions we will use antibody based immunotherapy to inhibit or abrogate cancer growth or spread.

Through immunotherapy:

We will select the 3 cell lines with the most robust phenotype in larvae based on **GO/NO GO** decision and test 10 antibodies on them. To achieve statistical significant results every experiment will be performed in three cohorts.

- 10 antibodies * 2 groups * 3 cell lines * 50 larvae per group * 3 cohorts = **9.000 larvae**

RNA isolation for transcriptomic analysis:

Using the PicoPure® RNA isolation kit we can isolate high quality RNA from low amounts of cells, for RNA isolation we need 30 larvae per condition. We want to test 2 conditions per cell line (wt and shRNA/ chemical inhibition of target gene) comparing two time points. Three cohorts will be necessary for the statistical testing of transcription levels. Using this methodology we will test 12 cell lines.

- 12 cell lines * 30 larvae per RNA isolation * 2 conditions * 2 time points * 3 cohorts = **4.320 larvae**

Total number of larvae in group I = 217.320 larvae

This point functions as a GO/NO GO step, only 8 cell lines inducing reproducible cancer phenotypes (cell proliferation, angiogenetic switch, invasion, interaction with immune cells of the host) and 10 inhibitors selected in this group based on their potential to inhibit one of the cancer phenotypes induced by engrafted cells will be validated in older age groups.

Group II: 7-8 dpf

For each type of cancer studied we will select the most potent cancer cell lines (8 cell lines). In this group we will also study the effect of inhibitors, immunotherapy and shRNA interference. The data of these experiments will be statistically tested through a Fischer's exact test, ANOVA or t-test. To acquire statistically significant differences in proliferation and dissemination as previously determined we need 20 larvae per group. This group size and three cohorts are required for subsequent publication of the acquired results.

Inhibition of metastasis :

We will select 10 inhibitors, which reduced the cancer phenotypes in group I based on a **GO/NO GO decision**. We will need two groups per experiment (inhibitor and vehicle control). For all inhibitors first the toxicity will be determined (in duplicate) for this we will need 80 larvae per inhibitor (3 concentrations, 1 control group with group sizes of 20 larvae per group). Every experiment will be performed in three cohorts.

Chemical inhibition:

- 10 inhibitors * 2 groups * 8 cell lines * 20 larvae per group * 3 cohorts = **9.600 larvae**

Through shRNA interference: Every experiment will be performed in triplicate. We will test 20 shRNA's on the 3 most promising cell lines.

- 20 shRNAs * 2 groups * 8 cell lines * 20 larvae per group * 3 cohorts = **19.200 larvae**

Through immunotherapy:

Every experiment will be performed in triplicate. We will test 5 antibodies on the 3 most promising cell lines based on the results obtained in group I (**GO/NO GO decision**). Antibodies will be mixed with cells before injection or inject into circulation 1 day after cell engraftment.

- 5 antibodies * 2 groups * 3 cell lines * 20 larvae per group * 3 cohorts = **1.800 larvae**

RNA isolation for transcriptomic analysis:

Using the PicoPure® RNA isolation kit we can isolate high quality RNA from low amounts of cells, for RNA isolation we need 20 larvae per condition. We want to test 2 conditions per cell line (wt and shRNA/ chemical inhibition of target gene) comparing two time points, three cohorts will be necessary for the statistical testing of transcription levels. Using this methodology we will test 8 cell lines.

- 8 cell lines * 20 larvae per RNA isolation * 2 conditions * 2 time points * 3 cohorts = **1.920 larvae**

Re-isolation of micro-metastatic cancer cells for cancer cell heterogeneity studies:

To study cancer cell heterogeneity and its underlying role in metastatic colonization we will re-isolate the micro-metastatic sub population from zebrafish xenografts obtained by engraftment of three cell lines (**GO/NO GO decision**).

Here we re-isolate and establish a cell line from cancer cells isolated from zebrafish xenografts for subsequent transcriptomic analysis.

This process is performed in three cohorts (3 parallel clones isolated from the same maternal line and 3 subsequent generation (re-isolate 1, 2 and 3 respectively)) to map the transcriptional underpinning of metastasis in this model.

- 3 cell lines * 200 larvae for re-isolation * 3 cohorts = **1.800 larvae**

Total number of larvae in group II = 34.320 larvae

Group III: 9-15 dpf

On the basis of highly promising results in the larval model (**GO/NO GO decision**) we will follow up the effects of treatments in the later larval model (9-15 days old). We will start with using 4 cell lines validated in earlier time points to micro-metastasize and induce blood vessel outgrowth. This prolonged experimental setup will be used as a validation step for chemical inhibitors found in group I and II. For each experimental condition 20 larvae are required (for treatment) and 20 control larvae (40 larvae in total).

Chemical inhibition:

- 12 inhibitors * 4 cell lines * 40 larvae per group * 3 cohorts = **5.760 larvae**

Inhibition of metastasis through immunotherapy:

Every experiment will be performed in three cohorts. We will test 2 antibodies on the 4 most promising cell lines (**GO/NO GO decision**).

- 2 antibodies * 4 cell lines * 40 larvae per group * 3 repeats per experiment = **960 larvae**

Total number of larvae in group III = 6.720 larvae

Group IV (up to 63 dpf):

To validate our findings in the previous experimental groups in a juvenile (non-larval) model we will use the most promising cell lines (**GO/NO GO decision**). These lines will be chosen from a pool previously established cell lines to keep the number of animals to an absolute minimum. These fish will be analyzed on metastatic spread, angiogenesis and proliferation furthermore samples will be taken for histological and transcriptional analysis.

Histological and transcriptomics analysis:

We will use 7 fish per condition, using 5 to ensure statistical significant data allowing for two extra individuals to correct for possible dropout.

4 cell lines * 7 fish per group = **28 larvae**

Chemical inhibition:

6 inhibitors * 4 cell lines * 7 fish per group * 3 cohorts = **504 larvae**

Total number of fish in group IV = 532 fish

Total number of animals required:

Group I = 217.320 larvae from 5-6 days

Group II = 34.320 larvae from 7-8 days

Group III = 6.720 larvae from 9-15 days

Group IV = 532 fish up to 63 days

Total 258.892 Fish

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

Based on the power analysis in the past we have found that in general 50 larvae per group (including lost during experiment) and minimal three biological cohorts are required for the robust generation of statistically significant groups and publishable results. Zebrafish are not inbred such as murine models therefore group size of 45-50 larvae and minimal three biological cohorts are required for statistically significant reduction of cancer cell burden upon treatment. The result of these experiments will be statistically tested through a Fischer's exact test, ANOVA or student t-test on the means of three biological cohorts.

- In general (based on the cancer type) only 5-10% of the larvae die due to mechanical damage during the engraftment procedure, subsequently only a minor fraction of the population (5-10%) dies during the experiment (largely dependent on the type of experiment and the aggressiveness of the cancer cells used).

Different *ex vivo* analysis techniques require different handling of the extracted tissue (e.g. cryo-sectioning or paraffin embedding). To reduce the number of animals that are required we will combine *ex vivo* assays for different parameters as much as possible.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Zebra fish (<i>Danio Rerio</i>)	Internal breeding	Larvae and juvenile	258.892	m/f	No	AB/TL

Provide justifications for these choices

- Zebrafish (*Danio rerio*) is quickly becoming a widely accepted cancer model, its optical transparency and high fecundity allow for high quality optical analysis of cancer progression up to single cell level in a semi-high throughput fashion.
 - The zebrafish used are bred at our institution.
 - Preliminary screens (both toxicity assays and optimizations of engraftment) will be performed in animals up to 5 days post fertilization, reducing the numbers of animals used for the final treatment strategies.
- All fish are monitored at least every other day for welfare status and euthanized immediately if any adverse effect occurs.

Species	<i>Danio Rerio</i>
Origin	Internal breeding at 5.1 lid2h
Life stages	Larvae and juvenile
Number	258.892
Gender	m/f
Genetic alterations	Yes, several lineage specific fluorescent reporter lines (e.g. vasculature, immune cells), mutant lines.
Strain	AB/TL

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

Animals are anaesthetised during the experiments. When symptoms of disease are observed humane endpoints will be applied.

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

In our experiments <5% of larvae die or show signs of discomfort 6-8 days post fertilization (dpf). Animals showing signs of discomfort (physiological malformation or lack of response to lateral line stimulation) will be removed from the experiment. After 8dpf and 6 days post injection (dpi) increase discomfort of animals may emerge. Animals showing locomotor abnormality (hypo or hyper activity, inactivity, twitching movements, swimming in circle), failure to feed or grow will be euthanized.

Explain why these effects may emerge.

The cancer engraftment introduces a relatively high number of cancer cells (which are required for the establishment of a robust cancer phenotype) into the zebrafish larvae, this can in some cases lead to an obstruction or perturbation of normal biological processes (perturbed liver function after liver invasion etc.). These adverse effects are intrinsic to cancer metastasis and cannot be avoided, although through thorough screening (in larvae up to 5dpf) and titration of the amount of cancer cells engrafted we will keep the adverse effects to a minimum.

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

For very aggressive cells we will titrate the amount of cells, enabling us to prevent severe discomfort (within the timeframe of the experiment). The animals will be checked every other day and euthanized immediately if any adverse effect occurs.

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

The animals will be checked every other day for signs of general discomfort (as good as is possible in zebrafish larvae) and discomfort (e.g. aberrant physiology, lack of movement). Humane endpoints for group I and II are lack of response to lateral line stimulus and gross malformation for group III and IV the same humane endpoint apply but are extended by cachexia (which is impossible to determine in larvae up to 8 days old). Humane endpoint is reached when the food uptake of the zebrafish is affected due to weakness and wasting of the body. When animals reach the humane endpoints they will be removed from the experiment.

Indicate the likely incidence.

Expected in <5%; maximally moderate discomfort no longer than 1 day.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

During the engraftment procedure the larvae are anesthetized. Within 30 minutes (after the anesthetic has worn off) the fish behave as normal, <5% of all larvae die during the engraftment. A schematic overview of the expected discomfort levels is provided in table 1. The level of discomfort is related to the progress of tumor growth. We expect that all animals that are injected with cancer cells experience mild discomfort. Although it is impossible to observe discomfort in the early stages of zebrafish development (2-3 weeks old). Expansion of tumor development can possibly induce malformation and abnormal swim behavior. This is considered to be moderate discomfort.

Table 1: Overview of expected discomfort in all zebrafish larvae experimental groups.

Description	Animal species/strain and sex	Number of animals	Discomfort (expected cumulative discomfort)	Discomfort is a sum of the following listed procedures:
Group I	5-6 days old zebrafish M/F	95%: 206.454	Mild	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (mild)
		5%: 10.866	Moderate	Anaesthesia Imaging

				Euthanasia Tumor development (moderate)
Number (Group I)		217.320		
Group II	7-8 days old zebrafish M/F	85%: 29.172	Mild	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (mild)
		15%: 5.148	Moderate	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (moderate)
Number (Group II)		34.320		
Group III	9-15 days old zebrafish M/F	70%: 4.704	Mild	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (mild)
		30%: 2.016	Moderate	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (moderate)
Number (Group III)		6.720		
Group IV	Up to 63 days old zebrafish M/F	20%:107	Mild	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (mild)
		80%: 425	Moderate	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (moderate)
Number (Group IV)		532		
Total number		258.892		

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement	<p>Metastasis is a complex multistep process where cancer cells not only modulate their own intrinsic properties based on the surroundings, but also must overcome multiple challenges to be able to successfully form a metastatic outgrowth. Currently there are no <i>in vitro</i> replacements that can mimic the complex interactions that cancer cell undergo during metastasis, although many of the preliminary screens will be performed in zebrafish larvae of up to 5 days before validating previous experimental approaches in older animals.</p> <p>In addition, the candidate genes and drugs to be used in the zebrafish models will be initially selected <i>in vitro</i> based of their effects on cancer cell migration and proliferation.</p>
-------------	---

Reduction	<p><i>Ex vivo</i> assays will be combined as much as possible to reduce the number of animals that are required.</p> <p>To reduce number of animals and refine their discomfort we will integrate GO/NO GO decisions after each step of the project. For example the selection of promising cell lines, optimization of engraftment procedure and initial toxicity test with drugs will be performed with larvae until 5-6 days post fertilization. We will select only promising xenograft models and drugs that can be tested without over toxicity. This pre-screen will allow selection of the optimal concentrations and delivery modality of drugs without toxic effects on the host and minimalized usage of laboratory animals for more advanced drug screens. The duration of the animal experiment will be minimalized in order to obtain pre-clinical relevant results.</p>
Refinement	Animals will be anaesthetized during engraftment to reduce the level of discomfort of the treatment.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

The proposed procedure is for fundamental and translational research, it does not consist of legally required research.

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Animals will be killed for *ex vivo* analysis.

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

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

The zebrafish will be killed using an overdose of the anesthetic Tricaine (this method is described in Annex IV of Directive 2010/63/EU). This procedure is currently common practice and is based on peer-reviewed scientific literature (Wilson JM, et al. (2009) J Am Assoc Lab Anim Sci. 48(6):785-789).

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Format Niet technische samenvatting

Let op: bij gebruik van dit word-format dient uiteindelijk alsnog het Excel-format te worden ingevuld voordat uw aanvraag vergund kan worden (zie Procesbeschrijving word-document NTS).

Please fill this form out in Dutch. Dit formulier moet ingevuld worden in het Nederlands.

=>Let op de richtlijn is ~500 woorden in totaal<=

Link naar EU Guidance document: [Working document on Non-Technical Project summaries](#)

Link naar CCD toelichting: [Toelichting bij de formulieren projectaanvraag](#)

Tab NTS

Country	NL
Language	NL
EU submission	<input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no
Title of the project	De zebravis als model voor ontdekking van nieuwe behandelingen tegen kanker
NTS identifier	Deze wordt door de CCD ingevuld
NTS national identifier	Deze wordt door EC ingevuld
Duration of the project	60 (in months) 01-01-2023 t/m 31-12-2027
Keywords/Trefwoorden	
Keyword 1	Kankerbestrijding
Keyword 2	Kankercellen
Keyword 3	Screenen van nieuwe medicijnen
Keyword 4	Genetische modificatie
Keyword 5	Kankercel-immuuncel interactie

<p>Purpose(s) of the project</p> <p>Objectives of the project/ Doel van het project</p> <p><i>Describe the objectives of the project (for example, addressing certain scientific unknowns, of scientific or clinical needs). Compulsory! Maximum length is 2500 characters</i></p> <p>De zebravis wordt de laatste jaren steeds meer gebruikt als model voor kankeronderzoek. Doordat de zebravistumoren op zowel genetisch als fenotypisch niveau veel overeenkomsten vertonen met de mens is de zebravis geschikt als modelorganisme voor een groot aantal humane vormen van kanker. Zebravislarven zijn doorzichtig en ontwikkelen zich buiten de moeder wat ze zeer geschikt maakt voor microscopisch onderzoek. Hierdoor kan de ontwikkeling van uitzaaiingen en de reactie van cellen in het immuunsysteem op de tumorcellen in levende zebravissen uitstekend in beeld worden gebracht. De combinatie van beschikbaarheid van fluorescente zebravislijnen, genetische modificatiemogelijkheden en gemakkelijke opname van chemicaliën uit het water, zorgt ervoor dat in dit model in een korte tijd fundamentele kennis vergaard kan worden.</p> <p>Wij hebben de afgelopen jaren, onder ^{5.1} [redacted] op grote schaal tumoredrag te bestuderen en tumoren te screenen op gevoeligheid voor geneesmiddelen. Met behulp van deze modellen hebben we essentiële genen geïdentificeerd die betrokken zijn bij het ontstaan van bijvoorbeeld prostaatkanker, botkanker en oogmelanomen. Dit project is een voortzetting van onze huidige onderzoekslijn.</p> <p>Het doel van dit project is het vergaren van kennis voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen tegen kanker door gebruik te maken van het zebravis xenotransplantaat model. Door de fundamentele mechanismen te bestuderen van de migratie van kankercellen, heterogeniteit, biologie van primaire uitzaaiingen en de interactie tussen kankercellen en de micro-omgeving van de gastheer, kan richting worden gegeven aan nieuwe kankercel- en gastheergerichte therapieën met potentiële klinische toepassing.</p> <p>De specifieke doelstellingen van de aanvraag zijn:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) De zichtbaarheid van het gedrag van de tumorcellen en de gastheer (lees model patiënt) verbeteren om zo tumorgroei, bloedvat ingroei, tumorverspreiding (uitzaaiing) en afweerreactie beter in kaart te brengen. 2) In kaart brengen van genetische doelwitten en potentiële geneesmiddelen met behulp van chemische en genetische screens.
--

- 3) Bevestigen dat geïnjecteerde humane kankercellen kunnen metastaseren naar de organen van zebravissen, en dat tumorontwikkeling geremd kan worden door middel van chemische inhibitoren en uitschakeling van genen die betrokken zijn bij het ontstaan van tumoren (shRNA interferentie).

In een breder perspectief willen met dit project aantonen dat het zebravismodel translationeel en relevant is voor onderzoek naar humane tumoren en dat het daarmee geschikt is voor de ontdekking van nieuwe medicijnen op een kosten- en tijdsefficiënte manier.

Potential benefits likely to derive from this project/ Mogelijke opbrengsten van het project

What are the potential benefits likely to derive from this project? Explain how science could be advanced, or humans, animals or environment may ultimately benefit from the projects. Where applicable, differentiate between short-term benefits (within the duration of the project) and long-term benefits (which may accrue after the project is finished). Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Het zebravismodel kan gebruikt worden om het testen van nieuwe medicijnen en behandelmethoden te versnellen, terwijl ook basiskennis over kankerprocessen verkregen wordt. Dit kan in een zebravismodel sneller gedaan worden dan in een muismodel, omdat de zebravislarven doorzichtig zijn, en processen gevolgd kunnen worden terwijl deze processen gaande zijn.

Dit onderzoek is van groot belang: kanker komt steeds meer voor in de maatschappij en huidige behandelmethoden zijn vaak nog niet optimaal.

Predicted harms

In what procedures will the animals typically be used/ Welke handelingen ondergaan de dieren?

In what procedures will the animals typically be used (for example, injections, surgical procedures)? Indicate the number and duration of these procedures. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

In het 5-jarig project worden hoofdzakelijk zebravislarven tot 6 dagen na de bevruchting gebruikt (217.320). Voor de validatie van resultaten worden larven tot 8 dagen (34.320) en tot 15 dagen na bevruchting (6.720) gebruikt. Om experimenten uit te voeren die meer vergelijkbaar zijn met de situatie in patiënten, willen we voor een zeer beperkt aantal cellen implantaties uitvoeren in 35-63 dagen oude vissen (532). Op dit punt is het volledige orgaanstelsel aangelegd en kan bepaald worden naar welke organen de cellen (geïnjecteerd in de bloedbaan) uitzaaien.

Hieronder wordt kort toegelicht welke technieken toegepast worden op de zebravissen.

Injectie

Zebravislarven van 2 dagen oud worden onder anesthesie gebracht door blootstelling aan het opgeloste anestheticum in een kweekschaal. Kankercellen of kanker geassocieerde cellen worden geïnjecteerd in de dooier, de bloedbaan of de hersenholte. Deze techniek wordt micro-injectie genoemd en wordt uitgevoerd met behulp van een microscoop en een kleine glazen naald. Vervolgens worden de larven teruggeplaatst in een kweekschaal om te herstellen van de anesthesie. Ze worden bewaard bij 34°C, een temperatuur waarbij zowel de larven als de geïmplanteerde kankercellen correct ontwikkelen en groeien. De larven worden regelmatig bekeken om het welzijn te controleren.

De micro-injectie techniek wordt verder toegepast om genen die betrokken zijn bij kankerontwikkeling te modificeren of uit te schakelen. Hiertoe worden zebravislarven van 4 dagen oud geïnjecteerd met constructen van genetisch materiaal die op het laboratorium zijn vervaardigd. Ook worden antilichamen toegediend aan de bloedsomloop van larven die eiwitten remmen die betrokken zijn bij kankerontwikkeling.

Blootstelling aan chemicaliën

Na het injecteren van kankercellen wordt een deel van de larven blootgesteld aan tumorremmende chemicaliën. De larven worden, op dezelfde wijze als hierboven beschreven, onder anesthesie gebracht. De chemicaliën worden direct toegediend aan het water in de kweekschaal of ze worden verpakt als nanodeeltjes (liposomen) en intraveneus geïnjecteerd.

Imaging

De ontwikkeling van kanker (cel migratie, micrometastasering, proliferatie, intra- en extravastie) in de zebravislarven en de effecten van de verschillende ingrepen wordt bestudeerd in levende zebravislarven door ze in detail te bekijken met verschillende microscopie technieken (fluorescentie-, stereo- en confocaalmicroscopie). Hiertoe worden de zebravislarven op verschillende tijdstippen (tot 15 dagen na fertilisatie) gefixeerd en geanestheseerd in een

kweekschaal en onder de microscoop bekeken. Na bestudering worden de larven teruggeplaatst in een kweekschaal om te herstellen van de anesthesie.

Euthanasie

Het experiment wordt beëindigd door het euthanaseren van de zebravissen ten behoeve van *ex vivo* analyses of omdat het humane eindpunt is bereikt.

Expected impacts/adverse effects on the animals/ Welk ongerief ondergaan de dieren en geef daarbij de verwachte ongeriefsclassificatie (terminaal, licht, matig of ernstig) aan.

What are the expected impacts/adverse effects on the animals for example pain, weight loss, inactivity/reduced mobility, stress, abnormal behaviour, and the duration of those effects? Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Tijdens de implantatie van kankercellen worden de 2 dagen oude larven verdoofd. Een klein deel van de dieren gaat dood na cel implantatie, of ondervindt ongemak van zeer snel groeiende kankercellen (minder dan 5%). De dieren worden afhankelijk van de onderzoeksvraag gedood na 6, 8, 15 of 63 dagen. Bij dieren die langer dan respectievelijk 8, 15 of 63 dagen leven zal er bij respectievelijk 15%, 30% en 80% matig ongerief voor kunnen komen door het uitgroeien van de kanker. Tijdens onze procedure wordt er alles aan gedaan om het welzijn van de proefdieren in acht te nemen.

Samengevat:

Zebravislarven tot 6 dagen oud (217.320): licht ongerief 95%, matig 5% (groep I).

Zebravislarven tot 8 dagen oud (34.320): licht ongerief 85%, matig 15% (groep II).

Zebravissen tot 15 dagen oud (6.720): licht ongerief 70%, matig 30% (groep III).

Zebravissen tot 63 dagen oud (532): licht ongerief 20%, matig 80% (groep IV).

Reasons for the planned fate of the animals after the procedure/ Beschrijf het eindpunt van de dieren en waarom dat zo gekozen is.

Please provide reasons for the planned fate of the animals after the procedure. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Een deel van de dieren wordt na afloop van het experiment gedood voor *ex vivo* analyses. De overige dieren worden na beëindiging van het experiment gedood om onnodig ongerief te voorkomen als gevolg van toenemende tumorgroei.

Application of the Three Rs

1. Replacement/Vervanging

State which non-animal alternatives are available in this field and why they cannot be used for the purposes of the project. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Uit voorgaand onderzoek blijkt dat de aangegeven stadia optimaal zijn voor dit onderzoek. De transparantie in de vroege ontwikkelingsstadia biedt mogelijkheden voor microscopische studies, die niet vervangen kunnen worden door *in vitro* kankermodellen, waar er niet naar interactie met verschillende gezonde cellen kan worden gekeken.

Waar mogelijk worden experimenten uitgevoerd in zebravislarven tot 5 dagen oud. Kandidaat genen en chemicaliën worden *in vitro* geselecteerd om het gebruik van proefdieren te beperken.

Metastasering van kanker is een complex proces waarin het gedrag van kankercellen beïnvloed wordt door de dynamische interactie met verschillende gezonde cellen in de omgeving van de gastheer. Op dit moment zijn er geen *in vitro* alternatieven die deze complexe interacties kunnen nabootsen.

2. Reduction./Vermindering

Explain how the numbers of animals for this project were determined. Describe steps that have been taken to reduce the number of animals to be used, and principles used throughout the project to minimise the number of animals used consistent with scientific objectives. Those practices may include e.g. pilot studies, computer modelling, sharing of tissue and reuse. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Om het aantal dieren te verminderen, worden GO/NO GO-beslissingen genomen na elke stap van het project waardoor het aantal dieren dat nodig is in vervolgonderzoek geminimaliseerd wordt. Zo wordt op basis van de resultaten van de experimenten met larven tot 6 dagen vastgesteld welke behandelingen uitgevoerd worden in vervolgonderzoek met larven tot 8 dagen en ouder. Het gebruik van de dieren wordt beperkt tot het minimum dat nodig is voor het verkrijgen van statistisch betrouwbare resultaten. Bovendien wordt de duur van de dierproeven beperkt tot het minimum dat nodig is om betrouwbare preklinische resultaten te verkrijgen. Daarnaast worden

zebravissen die gebruikt zijn in tumorontwikkeling experimenten hergebruikt voor weefsel verzameling ten behoeve van *ex vivo* analyses.

3. Refinement/Verfijning

Give examples of the specific measures (e.g., increased monitoring, post-operative care, pain management, training of animals) to be taken, in relation to the procedures, to minimise welfare costs (harms) to the animals. Describe the mechanisms to take up emerging refinement techniques during the lifetime of the project. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Anesthesie wordt gebruikt om het ongerief bij de dieren te verminderen. Doordat er live tumorgroei kan worden geanalyseerd is het mogelijk experimenten direct te beëindigen wanneer het relevante resultaat is bereikt, zodat larven niet nodeloos lang hinder ondervinden door de geïnjecteerde kankercellen.
De dieren worden dagelijks bekeken; bij afwijkingen worden zij direct uit het experiment gehaald.

Explain the choice of species and the related life stages/ Beschrijf de keuze voor de soort, het diermodel en de leeftijdsstadia.

Compulsory! Maximum length is 2500 characters

De zebravis is geschikt als model voor humane kanker vanwege de overeenkomsten in zowel tumorstructuur als activiteit van genen. Door de transparantie van zebravissen op jonge leeftijd, kunnen de uitzaaiingen en de reactie van cellen in het immuunsysteem op de tumorcellen live in beeld gebracht worden. De transparantie in de vroege ontwikkelingsstadia biedt mogelijkheden voor microscopische studies, die niet vervangen kunnen worden door *in vitro* kankermodellen.

Tab Purpose of the project

Basic Research: Oncology [PB1]

Translational and applied research: Human Cancer [PT21]

Choose a purpose

Choose a purpose

Choose a purpose

Tab Expected harms

What species and numbers of animals are expected to be used? What are the expected severities and the numbers of animals in each severity category (per species)?

Estimated numbers per severity				
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>				
Species	Non-recovery	Mild	Moderate	Severe
Zebra fish (Danio rerio) [A34]	0	240.437	18.455	0
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				

Tab Fate of animals kept alive

What will happen to the animals kept alive at the end of the procedure?

Estimated numbers per severity			
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>			
Species	Reused	Returned	Rehomed
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 19 oktober 2022 12:48
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216495
Bijlagen: 20221019_anticancer_Aanvraagformulier.docx; 20221019_anticancer_proposal.docx; 20221019_anticancer_appendix.docx; 20221019_anticancer_NTS.docx

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model." en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202216495.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 19-10-2022, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 19-10-2022 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD **5.1 lid2h** 202216495
2. Titel van het project: Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model
3. Titel van de NTS: De zebravis als model voor ontdekking van nieuwe behandelingen tegen kanker.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **5.1 lid2h**
 - telefoonnummer contactpersoon: **5.1 lid2h**
 - e-mailadres contactpersoon: **5.1 lid2h**
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 19-10-2022
 - aanvraag compleet: 19-10-2022
 - in vergadering besproken: 27-10-2022 & 06-12-2022
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot: 08-11-2022 t/m 30-11-2022
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 30-11-2022
 - advies aan CCD: 22-12-2022
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.
8. Eventueel horen van aanvrager
N.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 08-11-2022
 - Strekking van de gestelde vragen:

De DEC heeft, om een ethische afweging te kunnen maken, bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de voordelen van het gekozen vismodel ten opzichte van een muismodel, hoe men weet of de gebruikte tumorcellen, die in feite een zeer kleine 'steekproef' is uit heterogeen tumorweefsel, representatief zijn voor de specifieke tumor, waarom de larven niet gevoerd worden en of dit gepaard gaat met ongerief, de herkomst van de te testen cellijnen,

referenties met betrekking tot het toepassen van de PDX strategie om de kwaadaardigheid van de tumorcellen te voorspellen, wat de keuze voor de toedieningsroute bepaalt en welke criteria hiervoor worden gehanteerd, de mogelijkheid om het aantal benodigde dieren te verminderen, of de toe te passen inhibitor per type kanker wordt gekozen, of dat alle 20 inhibitors geschikt zijn voor alle typen kanker, op welke parameters de poweranalyse is gebaseerd, of de uitval voor alle verschillende engraftment procedures gelijk is en de humane eindpunten. Daarnaast heeft de DEC verzocht de NTS aan te passen.

- Naar aanleiding van deze vragen zijn het projectvoorstel, de bijlage en NTS door de aanvrager aangepast en zijn de antwoorden op de vragen opgenomen in de aangepaste documenten.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling: het bestuderen van de pathobiologie (tumor initiatie, - differentiatie, - infiltratie en – metastasering) van humane tumorcellen in zebravis larven. Daarnaast wordt dit larvale zebravismodel ingezet als bio-essay voor het screenen van aangrijpingspunten voor medicamenten: "*high-throughput target discovery and drug lead identification*". De uiteindelijke doelstelling is om in dit zebravis model waarin humane tumorcellen worden ingespoten (xenograft) genetische kankerdoelen te ontdekken en medicamenten te testen op hun werkzaamheid tegen tumoren van patiënten, "*personalized drug response*". De onderzoeksopzet in deze aanvraag heeft een heldere opbouw en de afzonderlijke stappen vertonen een logische volgorde en samenhang. Het is helder welke handelingen en interventies individuele dieren zullen ondergaan echter het is voor de DEC leden niet goed mogelijk om in te schatten welk ongerief de vissenlarven van de interventies zullen gaan ondervinden. Er is een kennislacune met betrekking tot de daadwerkelijke gevolgen voor de (fysiologie) van ZF larven als er XPD tumorcellen worden ingebracht die uitgroeien tot tumor achtige structuren. Vooralsnog kunnen de meeste DEC leden (6 van de 7), vooral gezien de lange ervaring van de aanvragers met ZF onderzoek, wel 'leven met' de ongeriefclassificatie zoals gegeven door de aanvrager. Het is voor de DEC leden wel duidelijk dat het gebruik van ZF larven veel voordelen biedt voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen. De aanvraag betreft de inzet van circa 142.280 ZF-larven die

matig (14.860) en licht (127.420) ongerief zullen gaan ondervinden van de interventies. De haalbaarheid van de doelstellingen (binnen de termijn van vijf jaar) is volgens de DEC, gezien de aanwezige kennis en ervaring, het beschikbare budget, de personele capaciteit, de samenwerking met diverse onderzoeksgroepen en de eerder behaalde onderzoeksresultaten voldoende onderbouwd. De meerderheid van de DEC is ervan overtuigd dat op zorgvuldige wijze, met behulp van heldere go/no-go momenten, de voortgang van het project beoordeeld wordt waardoor er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Eén lid is van mening dat er geen heldere go/no-go momenten zijn; zie het minderheidsstandpunt. De DEC acht, gezien de uitgebreide track record op dit specifieke onderzoeksterrein, de onderzoeksgroep uiterst capabel om de voorgestelde onderzoeken, met inachtneming van de 3 V's, uit te kunnen voeren. Gezien bovenstaande beoordeling van de inhoud is de DEC van mening dat de aanvraag in voldoende mate voldoet aan de definitie van een project, de aanvraag overeenkomsten vertoont met voorbeeld **1A** uit de handreiking, het projectvoorstel navolgbaar is en dat daarmee de vergunningaanvraag ethisch toetsbaar is.

2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Deze aanvraag heeft een tweeledig direct doel, onderzoeken hoe humane tumoren zich ontwikkelen in het zebravismodel en daarnaast het ZF- PDX tumormodel screenen op therapeutische aangrijpingspunten. De uiteindelijke doelstelling bij toepassing van het ZF-PDX model is, nieuwe genetische targets te vinden en/of therapeutische aangrijpingspunten voor de behandeling van de tumoren bij de betrokken patiënten; "personalized medicine". De DEC is, na het inwinnen van aanvullende informatie, van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het verkrijgen van meer inzicht in zowel de moleculaire mechanismen van tumorgroei als de tumorremming door nieuwe medicijnen/chemicaliën, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de samenleving met in het bijzonder de huidige en toekomstige kankerpatiënten.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, ze worden ingespoten met humane tumorcellen en gedurende de proeven zullen de dieren mogelijk stress en pijn ondervinden.
Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: het beschreven onderzoek zal leiden tot nieuwe wetenschappelijke kennis en inzichten over de mechanismen van tumorontwikkeling en in vivo effectiviteit van de nieuwe antikankerbehandelingen. Ook kunnen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door nieuwe publicaties.
Waarden die voor de samenleving en in het bijzonder voor kankerpatiënten bevorderd worden: meer inzicht in de moleculaire aspecten van tumor ontwikkeling is cruciaal om (heel gericht) nieuwe targets te kunnen vinden welke bepaalde kankerpatiënten een perspectief kunnen gaan bieden op een adequate behandeling.
6. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. Het project bouwt verder op langlopend onderzoek dat wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep in samenwerking met andere grote (inter)nationale onderzoeksgroepen. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met kankeronderzoek in zebrafissen en heeft in het verleden al een groot aantal humane tumorcelmodellen ontwikkeld. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald. Naar inziens van de DEC beschikt de betrokken onderzoeksgroep over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om zoveel mogelijk te voorkomen dat mens, dier en milieu negatieve effecten als gevolg van de voorgestelde dierproeven.
8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC, mede gelet op de uitgebreide ervaring van de vakgroep, leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van een afwijkende huisvestingslocatie, hergebruik, bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methode voor anesthesie is conform de Richtlijn. De vissen zullen worden gedood volgens de richtlijn 2010/63/EU of dmv een snelle afkoelmethode. Dit is naar inziens van de DEC voldoende onderbouwd.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van de vergunninghouder beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De dieren zullen merendeels licht ongerief en cumulatief maximaal matig ongerief ondervinden als gevolg van de tumorinjecties, het ontstaan van tumoren en metastasen. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.
12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast omdat de dieren geïnjecteerd worden met humane tumorcellen waardoor ze tumoren en metastasen ontwikkelen. Daarnaast worden de dieren gedood in het kader van de proef. De integriteit wordt ook gedragsmatig aangetast doordat de tumorontwikkeling mogelijk kan leiden tot misvorming en abnormaal zwemgedrag.

13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de appendix.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de zebravis als diermodel voor tumorontwikkeling voldoende onderbouwd. Tumorontwikkeling en metastasering zijn complexe processen waarbij meerdere organen, bloed en celtypen een rol spelen. Het is daarom niet mogelijk om deze in vitro na te bootsen. Kandidaat-genen en geneesmiddelen die in de zebravismodellen zullen worden gebruikt zullen in eerste instantie in vitro worden geselecteerd op basis van hun effecten op de migratie en proliferatie van kankercellen. De larven zijn zeer geschikt voor deze studieopzet vanwege de optische transparantie waardoor hoogwaardige optische analyse van kankerprogressie tot op het niveau van een enkele cel mogelijk is. Dit wordt, naar de mening van de DEC duidelijk en voldoende gemotiveerd en de DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
15. DEC heeft geconstateerd dat de aanvraag een groot aantal dieren betreft en heeft daarover vragen gesteld die voor de meerderheid van DEC verhelderend en bevredigend zijn beantwoord. In het project wordt tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven door alleen veelbelovende xenograft-modellen en medicijnen te selecteren die kunnen worden getest zonder overmatige toxiciteit. Deze prescreening maakt het mogelijk om de optimale concentraties en toedieningsmodaliteit van medicijnen te selecteren zonder toxische effecten op de gastheer en minimaal gebruik van proefdieren voor meer geavanceerde drugscreens. Daarnaast zullen ex vivo assays zoveel mogelijk gecombineerd worden om het aantal benodigde dieren te verminderen. Daarbij heeft de aanvrager duidelijk gemaakt dat er voor het inzetten van oudere larven, die meer ongerief zullen ondervinden, harde go – no/go criteria zullen gelden. Naar inziens van de meerderheid van de DEC zijn de beschreven go/no-go momenten realistisch, helder en eenduidig omschreven, waardoor er geen onnodig onderzoek zal worden uitgevoerd. De DEC acht dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd door gebruik te maken van adequate anesthesie voor het inspuiten van de tumorcellen. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate ingezet worden.
19. Alle dieren worden in kader van het project gedood waarna weefsel wordt afgenomen voor verdere analyse. De vissen worden gedood door middel van een overdosis van

het verdovingsmiddel Tricaine (zoals beschreven in bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU) of door afkoeling zoals recent beschreven is in een artikel in Biology. Dit is naar inziens van de DEC voldoende onderbouwd.

20. Alle dieren worden gedood om wetenschappelijke redenen.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het onderzoek in zebravislarven naar pathobiologische aspecten van tumorontwikkeling en – metastasering en naar therapeutische aangrijpingspunten met als uiteindelijk doel het opsporen van moleculaire of genetisch targets om deze tumorprocessen te kunnen blokkeren de inzet en het doden van 142.280 zebravislarven en het cumulatief licht tot matig ongerief dat de dieren wordt aangedaan?

2. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling: het bestuderen van de pathobiologie (tumor initiatie, - differentiatie, - infiltratie en – metastasering) van humane tumorcellen in zebravis larven. De doelstelling is om in dit zebravis model waarin humane tumorcellen worden ingespoten (xenograft) nieuwe medicamenten te testen op hun werkzaamheid. Waarden die voor proefdieren, de zebravis larven, in het geding zijn: het proefdieronderzoek is nadelig voor de larven als gevolg van het, te verwachten, licht tot matige ongerief, het gedood worden en de aantasting van de fysieke integriteit van het dier.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel door het vergaren van nieuwe inzichten en onderzoeksresultaten, die waarschijnlijk gepubliceerd kunnen worden.

Waarden die voor de kanker patiënten bevorderd worden: een mogelijk groot voordeel omdat de informatie die verkregen wordt in de toekomst van waarde kan zijn voor de ontwikkeling van therapeutische strategieën die de progressie van kanker en de daaraan gerelateerde metastasering van tumorcellen kunnen verminderen.

De meerderheid van de DEC is van mening dat de belangen van de samenleving en die van huidige of toekomstige kanker patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.

Het is evident dat er behoefte is aan nieuwe effectieve kankerbehandelingen die tumor - en patiënt specifiek zijn. Dit voorgestelde onderzoek kan daaraan gaan bijdragen. De DEC acht de voorgestelde onderzoeken in zebravis larven van essentieel belang om inzicht te krijgen in de moleculaire mechanismen van tumorontwikkeling en om nieuwe therapeutisch targets te kunnen identificeren. Hiertoe zullen zebravis larven worden gebruikt. De DEC is van mening dat dit onderzoek niet proefdiervrij kan worden uitgevoerd en vind dat de inzet van 142.280 zebravis larven en het ongerief dat de dieren zullen ondergaan voor dit onderzoek gerechtvaardigd is.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De meerderheid

van de DEC is van mening dat de waarden die voor de uiteindelijke doelgroep, de patiënten met kanker, bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft om met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De meerderheid van de DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kan worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren ethisch gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden:

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Een van de DEC leden geeft een negatief advies. "De hoofdreden om tegen dit onderzoek te zijn is de enorme hoeveelheid dieren die men aanvraagt, terwijl tegenover die hoeveelheid dieren géén hele lage hoeveel ongerief per dier staat. Hieronder geef ik mijn argumentatie in meer detail.

Dat er zoveel dieren aangevraagd worden, heeft er niet alleen mee te maken dat zebravissen een grotere genetische diversiteit vertonen dan bijvoorbeeld muizen die als proefdieren worden gebruikt. De hoeveelheid aangevraagde proefdieren is ook zo hoog omdat het onderzoek heel breed is opgezet. Zoals in de laatste alinea van het project proposal staat samengevat, is men is van plan maar liefst vier typen kankercellen, 20 inhibitors, 40 siRNAs en 10 antilichamen te testen. De zebravis wordt door de onderzoekers als 'high-throughput' model gepresenteerd om al deze (waarden van) variabelen te kunnen testen, en dit is blijkens het antwoord op onze vraag 2 de hoofdreden om voor zebravissenonderzoek te kiezen. Het doen van veel dierproeven op veel dieren is daarmee inherent aan de onderzoeksstrategie, en dat staat op gespannen voet met de ambitie om minder proefdieren te gebruiken.

Een hoofdargument dat de onderzoekers geven om zoveel dierproeven te willen doen is dat ze 'personalized medicine' willen bevorderen. Door zoveel (waarden van) variabelen te onderzoeken, is klaarblijkelijk het idee, kan voor een individuele patiënt

worden gekeken op welke onderzoekssituatie zijn of haar toestand het meest lijkt en kan zo de therapie worden bepaald. Zo ingevuld stimuleert het ideaal van 'personalized medicine' het gebruik van veel proefdieren en staat het haaks op de genoemde ambitie om het aantal dierproeven te verminderen (die mijns inziens samenhangt met de erkenning van de intrinsieke waarde van proefdieren).

Het is hier overigens ook van belang dat de go/no-go momenten, zoals ze nu geformuleerd zijn, geen mogelijkheid bieden om het aantal proefdieren te verminderen. Ze dienen niet om te bepalen *hoeveel* waarden er van bepaalde variabelen worden getoetst, maar alleen *welke*; het aantal waarden dat getest gaat worden ligt vast. Bij de eerste zogenoemde go/no-go beslissing (zie appendix pagina 3) staat bijvoorbeeld al vast dat er 6 cellijnen en 40 LNPs-shRNAs getest zullen worden en wordt alleen een keuze voor specifieke cellijnen en LNPs-shRNAs gemaakt. Nergens in het onderzoeksvoorstel of één van de andere documenten wordt beargumenteerd of aannemelijk gemaakt dat zebrawislarven bijzonder weinig ongerief van het onderzoek zouden ondervinden. Het aantal dieren dat 'mild' ongerief zal ondervinden wordt op 127.420 ingeschat en het aantal dat 'matig' ongerief zal vinden op 14.860; er is geen sprake van dat 'mild' en 'matig' ongerief voor een zebrawislarve iets heel anders zou inhouden dan voor muizen. Gezien de enorme aantallen dieren mag niet te lichtvaardig worden aangenomen dat het met het pijn of lijden van zebrawissen wel mee zal vallen, als we dat niet goed weten. Daarnaast is twijfelachtig of het gebruiken en doden van proefdieren op zich ethisch neutraal is, zelfs als alles pijnloos gebeurt. Ook vanuit dat oogpunt is het grote aantal dieren dat is aangevraagd problematisch.

Ik kan me moeilijk voorstellen dat een onderzoek met soortgelijke aantallen muizen positief ontvangen zou worden, en het mag niet zo zijn dat de belangen van zebrawissen dan wel zebrawislarven minder meegeteld worden dan die van muizen zolang daar geen goede inhoudelijke redenen voor gegeven worden. Die redenen heb ik noch in de aanvraag noch in de bespreking van de DEC voorbij horen komen. Er was bij de DEC wel sprake van een gevoel dat zebrawissen er toch minder toe deden (al dan niet omdat hun vermogen tot lijden volgens de persoonlijke inschatting van de spreker beperkt zou zijn), maar de onderbouwing daarvan was zeer beperkt. Naar mijn idee wordt er dus zonder goede gronden een onderscheid gemaakt op basis van soort en dat vind ik ethisch problematisch.

Hoewel ik het onderzoek zeker een substantieel belang toeken – het betreft ernstige aandoeningen die veel voorkomen en ik geloof best dat het nieuwe inzichten en betere behandelmethoden kan opleveren – geef ik om de bovengenoemde redenen een negatief advies. De aanvragers hadden mijn inziens genoeglijk moeten aantonen dat zebrawislarven een zeer beperkt vermogen om te lijden hebben, óf het onderzoek veel minder breed en met inbegrip van goede go/no-go criteria moeten opzetten, zodat er niet zo ontzettend veel dieren nodig zouden zijn."

3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen duidelijke dilemma's naar voren gekomen. Wel is het voor de DEC leden niet goed mogelijk om in te schatten welk ongerief de vissenlarven van de interventies zullen gaan ondervinden.



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 the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

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

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal
- 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 2.1.

Despite continuous effort cancer mortality remains 8.2 million per year worldwide. This number accounts for almost 15% of worldwide deaths (1). Although mortality rates are decreasing, cancer incidences are expected to raise in the next two decades what underlines the necessity for more effective anti-cancer

strategies. There is a clear need to develop more sophisticated bioassays and models that go beyond the *in vitro* use of classical cancer cell lines and *in vivo* mouse xeno-transplantation studies, and allow medium to high-throughput target discovery and drug lead identification. To this aim analyses within a complete organism are needed to grasp the full complexity of the interaction between treatment, cancer and host.

Zebrafish (*Danio rerio*) are increasingly used as a model organism to study cancer (2). Benefits include large clutch size, *ex utero* development and easy manipulability of larvae (3). There is high conservation of oncogenes and tumor-suppressor genes between zebrafish and human therefore data collected in zebrafish are relevant for humans (4). The histology of zebrafish tumors has been shown to be highly similar to tumors found in human cancers (5). The immune system of the zebrafish resembles that of higher vertebrates in many aspects. Zebrafish possess the full set of immune cells which mediate the innate and acquired immune response in mammals. Many of the genes and critical pathways that are required to grow these features are highly conserved between humans and zebrafish. The zebrafish embryo offers an unparalleled opportunity to study innate immune responses without the influence of an acquired response, which starts to operate much later in development. The adaptive immune system in zebrafish does not reach maturity until 4 weeks post-fertilization (6), allowing circumvention of cell graft-host rejection by using zebrafish in early stages. The interconnection between the innate and adaptive immunity can be addressed in the adult animals therefore the final validation of results obtained in the larval stages will be conducted in adult animals.

Zebrafish (ZF) larvae can absorb various small molecular weight compounds from water, which is advantageous when screening for anti-cancer compounds (7). In addition, drugs can be administered in dissolved or nanocarrier-encapsulated form by injection into the blood (IV) or behind the eye (8-10). Recently we have shown that ZF cancer models are suitable to test delivery modalities and efficacy of light activated drugs (10-11). Zebrafish experiments require much less material than in the mouse model to assess drug efficacy. Routinely we inject 200-500 cancer cells per larvae and use 1 ml of drug solution for 6 individuals once administered from egg water by immersion. Alternatively we inject 1-2nl of dissolved or nanoparticles-containing drugs (9-11). The experimental costs are low and procedures are simple and fast. The use of zebrafish in drug discovery in a time- and cost- effective manner initiated many clinical trials during the last two decades (7). For melanoma, a presently on-going phase II/III clinical trial of leflunomide combined with vemurafenib is the first to arise from initial screens in zebrafish.

Harnessing of transgenic lines with fluorescent vasculature, neutrophil granulocytes or macrophages, allows live, non-invasive imaging of proliferation, migration and tumor-associated neo-angiogenesis and interaction with microenvironment at the single cell resolution in the contacts of the entire organism within 1 week (12-13).

5.1 lid2h

[Redacted text block]

5.1 lid2h

[Redacted text block]. Several key publications and participation in many international (5.1 lid2h [Redacted text block]) and national (5.1 lid2h [Redacted text block])

[Redacted text block] medical grants demonstrated that the zebrafish is an excellent model system for this purpose as xenotransplantation with human carcinoma cells is possible and cancer cell migration, proliferation, angiogenesis, micro-metastasis and immune response can be monitored *in vivo* within the developing tumor (9-11, 14-33, selected publications).

5.1 lid2h

[Redacted text block]

5.1 lid2h

In combination with an automated bio-imaging platform (21) the zebrafish xenografts models were applied for genetic and chemical screens to select potential drug targets for different human cancers.

5.1 lid2h

All previously published results provided robust evidence that pharmacokinetics per se is not a cross-species barrier for ZF-PDXs (3, 31, 34, 35). First clinical trials using ZF-PDX system are initiated in the USA and many are in pipeline in Europe. Importantly, olaparib plus temozolamide treatment tested in zebrafish adult PDX and xenograft models of rhabdosarcoma, without additional model prerequisites, is in phase I of clinical trial (3, 7, 35). Recently, our lab has established 5.1 lid1c

5.1 lid2h

to perform a high-throughput screen of drugs on primary biopsy materials as well patient derived organoids (31, 32 and Figure 2).

To conclude, in past years we successfully established ZF-xenograft models to study cancer pathogenesis, metastases mechanism and treatment. Importantly we have proven translational value of this model for clinical applications. 5.1 lid2h

In this new project we will engraft into zebrafish immortalized cancer cell lines as well primary cells derived from patient cancers to screen for drug targets and test the personalized drug response under conditions that may mimic *in vivo* environment. We plan to use primary cells derived from prostate, glioblastoma, breast and eye patient tumors or cells derived from PDX tissues initially propagated in mice models and test 20 inhibitors, 40 siRNAs and 10 antibodies prioritized based on the available knowledge from literature as well our anti-cancer measurements in cells and zebrafish xenograft models until 5 days post fertilization (dpf).

Although zebrafish xenograft model has many advantages it still involves the use of animals and we will elaborate in this 5 year project proposal on the strategy to use as few animals as possible to reach our goals.

1. Globocan 2012 http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
2. Liu S, Leach SD. Zebrafish models for cancer. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 71-93.
3. Fazio M, et al. Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20: 263-273; doi: 10.1038/s41568-020-0252-3.
4. Howe K, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013; 496: 498-503;doi: 10.1038/nature12111
5. Amatruda JF, Shepard JL, Stern HM, et al. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer cell* 2002; 1: 229-231.
6. Lam SH, Chua HL, Gong Z, et al. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev Comp Immunol* 2004; 28: 9-28.
7. Patton EE, Zon LI, Langenau DM. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nature reviews. Drug discovery*. 2021; 20:611-628; DOI:10.1038/S41573-021-00210-8.
8. Sieber S, et al. Zebrafish as a preclinical in vivo screening model for nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2019; doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.001.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

12. Lawson ND, Weinstein BM. In vivo imaging of larval vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 2002; 248: 307-318.
13. Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DM, et al. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 2006; 108: 3976-3978.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

35. Yan C et al., Visualizing Engrafted Human Cancer and Therapy Responses in Immunodeficient Zebrafish 2019, Cell 177, 1903–1914; doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.004

36. Pattipeiluhu R, et al. Anionic Lipid Nanoparticles Preferentially Deliver mRNA to the Hepatic Reticuloendothelial System. Advanced Materials 2022; DOI: 10.1002/adma.202201095

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

Ultimate aim of this project is: **discovery of genetic cancer targets and assessment of drugs for incurable solid cancers using zebrafish xenograft model.**

Immediate goals of this project will concentrate on the fundamental mechanisms controlling invasive cell migration, proliferation, tumor angiogenesis, metastatic initiation and interaction with host microenvironment **to predict targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies**. This will be achieved by: i) chemical inhibition of tumor phenotypes in engrafted larvae, ii) gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by LNP-Si-RNAs intravenous injection to block cancer or host genes responsible for cancer progression; iii) through inhibition of cancer phenotypes with selected antibodies, iv) transcriptomic, proteomics and metabolomics (Omics) analysis of cancer cells in culture versus cells forming experimental metastasis in the engrafted larvae. For this approach we will use immortalized cancer cells from zebrafish, mice and human origin as well patient-derived material directly from patients or after a propagation step in the organoids culture, or in mouse patient derived xenografts (PDX). The cancer phenotypes (cell migration, angiogenesis, proliferation, metastatic onset, interaction with host microenvironment) induced by engraftment of fluorescent cancer cells will be microscopically examined and the relative tumor burden will be calculated by measuring the integrated fluorescent density in the fish at different days post injection (dpi) and normalized with respect to the burden at 1dpi.

The ZF-PDX strategy is also a powerful tool to predict aggressiveness of the primary human cancer cells and will be used for staging and assessment of prognostic value of the tumor cells derived from patients. This animal bio-imaging assay will serve as a first-line *in vivo* screening step in the anti-cancer drug discovery pipeline and optimization of drug administration modalities reaching the maximal efficacy without side-effects. In addition, the transcriptomic, proteomics and metabolomics analysis of cancer cells as well surrounding host stroma cells (e.g. macrophages) forming experimental metastasis in the engrafted larvae will lead to the identification of novel therapeutic targets for anti-cancer treatment. Selected targets will be initially validated by gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by LNPs-Si-RNA injection to block cancer or host genes responsible for cancer progression. The stringently selected, promising candidates will be further validated by engraftment of human cancer cells into the adult immunocompromised zebrafish to eliminate possible developmental artefacts induced by engraftment of human cancer cells into the zebrafish larvae (Group IV, see appendix). Final validation will be performed by our collaborators in the mouse pre-clinical models.

We believe that our immediate goals to achieve the ultimate goal are achievable because we have already established many models for incurable cancer types which will be used for basic and therapy-focus research in this project.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

All expertise, technology, chemical libraries and biological material, obtained from commercial sources or our medical collaborators justified by the material transfer agreements between different institutions are in place to conduct this project.

We have a strong clinical network of national [5.1 lid1c](#) and international ([5.1 lid1c](#)) collaborators with whom we will work together to utilize the full potential of zebrafish cancer models for translational research.

Many molecular and cellular components involved in tumorigenicity are highly conserved between zebrafish and human making this platform clinically relevant for translational, pre-clinical research towards personalized medicine. Successful integration of the zebrafish platform into preclinical anticancer drug target discovery and lead compound selection will reduce usage of rodents, time and costs.

Our institute is a well-known center of expertise for zebrafish cancer biology. [5.1 lid2h](#)

For example, to study the dynamic and reciprocal interactions between tumor cells and their host microenvironment [5.1 lid2h](#)

This resulted in rapid formation of an experimental micro-metastasis, allowing time-resolved imaging of this process at single-cell level within one week (Figure 1).

5.1 lid2f

5.1 lid2f

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

Cancer continues to pose a major therapeutic challenge, as for some solid cancers, the prospects of cure remains remote, whilst their incidence stays high. A predominant challenge in developing curative cancer treatment is the co-evolution of tumor with its microenvironment. This project will provide more **scientific** insight into the mechanism of cancer development and its host microenvironment interactions to predict targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies.

Novel molecular signatures representing cancer aggressive drivers will be identified and attenuated by chemical or genetic intervention. In addition, development of the patient derived xenotransplantation models in zebrafish will allow testing of the personalized drug response in a time- and cost- effective manner with unprecedented **social** relevance.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

The research activities performed within the project will lead to new scientific knowledge and insights on the mechanisms of tumor development and *in vivo* efficacy of the new anti-cancer treatments. 5.1 lid2h

5.1 lid2h involved researches and students will benefit from knowledge generated in the immediate goals of this project. This innovative research with scientific and medical relevance will embark them with the experimental and theoretical knowledge to boost their future careers and job chances. Proposed project will lead to discovery of genetic cancer targets and assessment of drugs efficacy using patient material therefore in long terms patient will be the most important stakeholders. Success of this project should also attract interest of biotech companies to promote the utilization of obtained knowledge, model applications and therapy implementation towards the clinic. Importantly, the zebrafish are stakeholders because they are bred, used in procedures and killed under strict conditions using state-of-the-art facilities for this project. Their interest is that the that discomfort and the animal numbers are reduced to a minimum.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

Our overall strategy is to use the zebrafish xenograft model to study the fundamental mechanisms controlling cancer cell migration, heterogeneity, biology of metastatic initiation and interaction with host microenvironment to predict targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies with potential clinical application. For this purpose, we will use the overall design of the project illustrated in the schematic overview of overall approach (Figure 2) which composes of five different steps:

- 1) **engraftment** of the immortalized cells isolated from mice, zebrafish, human cancers and primary cancer cells directly derived from patients or after PDX propagation in mice or in organoids culture into zebrafish wild type, fluorescent reporter or mutant larvae or juvenile fish;
- 2) **treatment/intervention:** a) chemical inhibition of tumor growth in engrafted larvae will be performed by absorption of various small molecular weight compounds from growth medium or by IV injection of dissolved or nanoparticles-encapsulated drugs; b) genetic inhibition will be conducted by gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by LNP-Si-RNAs IV injection to block cancer or host genes responsible for cancer progression; c) through immunotherapy with selected antibodies;
- 3) **data acquisition** by direct fluorescent imaging of tumor progression and histological examination with cancer markers and identification of novel molecular signatures by the transcriptomic, proteomics and metabolomics (Omics) analysis of cancer cells in culture versus cells forming experimental metastasis in the engrafted larvae;
- 4) promising **candidate gene targets and drugs** will be selected based on their efficacy on metastatic dissemination, angiogenesis and metastatic onset in zebrafish larvae until 8 dpf (Group I);
- 5) **validation of prioritized candidate gene targets and drugs** by engraftment of selected human cancer cells into older larvae and sporadically into immunocompromised juvenile zebrafish for examination of their anti-tumor effects (as described in step 2) on more progressed tumors (metastatic) in the contacts of fully developed organs in older larvae and juvenile (Group II and III).

In the first step: **engraftment**, fluorescently labeled cancer cells derived from mice, zebrafish and human cancers will be injected into the perivitelline space, blood circulation, behind the eye or brain cavity of 2 days old anaesthetized zebrafish larvae (wild-type, larvae with mutation in cancer related pathways, or larvae with fluorescent markers for different tissues) to microscopically monitor cancer cell migration, proliferation, angiogenesis and interaction with host stroma cells. To this aim cancer cells for

example in red will be engrafted into larvae with green vessels and blue immune cells and metastatic behavior will be assessed by a non-invasive bio-imaging platform already developed in our group. In this pilot study (Group I: 5-8dpf) optimal injection site and cell lines, which survive in the larvae will be prioritized for further investigation (GO/NO GO decision). In order to monitor and eventually inhibit the crucial cancer phenotypes as metastatic dissemination, proliferation, angiogenesis, interaction with host microenvironment (vessels, stroma and immune cells of zebrafish) and metastatic initiation we will extend duration of the experiment until 6 or 8 days post fertilization (dpf) without feeding of the larvae (Group I). For promising candidate gene targets and drugs, selected based on their efficacy on metastatic dissemination, angiogenesis and metastatic onset in zebrafish larvae until 8 dpf (Group I) after GO/NO GO decision experiments will be followed for additional 7 days to prove their effect on more progressed, metastatic tumors (Group II: 9-15 dpf) and finally validated in juvenile with developed organs to prove that results obtained in the larval stages are relevant for adult animals (Group III: up to 63 dpf).

After establishment of the engraftment conditions (injection site, cell line, drug concentration) up to day 5, the engrafted larvae will be subjected to different **treatments**. To inhibit metastatic onset engrafted and control larvae will be divided in 24 well plates (6 larvae per well) and exposed to selected concentration of drugs by adding them into the medium one day post implantation and refreshed every second day. Dissolved drugs or encapsulated in nanoparticles will be tested by retro-orbital or IV injection of 1-2 nL into 4 dpf anaesthetized larvae. Genetic inhibition of metastasis will be conducted by gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by IV injection of 1-2 nL of LNP-Si-RNAs into 4 dpf anaesthetized larvae to block cancer or host genes responsible for cancer progression. For immunotherapeutic tests antibodies will be injected into the circulation one day post engraftment of cancer cells. To inhibit already formed tumors the antibodies and drugs will be directly injected into the tumor or circulation approximately at 9-15 dpf. The control group will be injected with the solvent at the same time point. The microscopic **data acquisition** will be conducted in anaesthetized larvae. The **candidate gene targets and drugs** will be prioritized based on the therapeutic efficacy quantified by microscopy, histology and transcriptomics approaches. Selected drugs will be further refined and therapeutic efficacy will be validated. For **validation** selected control cancer cells and cells with the candidate genes genetically modified by RNA interference will be injected into 2 dpf larvae (wild-type, larvae with mutation in cancer related pathways, or larvae with fluorescent markers for different tissues) and exposed to prioritized drugs as previously described. **Discovery of new gene targets and drugs** will be evaluated in near-patient in vivo mice models by our collaborators outside of this project. The different steps of the project form an integrated platform for preclinical anticancer drug target discovery and lead compound selection. The different steps of the projects form a coherent procedure required to achieve our milestones:

1. Number and characterization of ZF-xenotransplantation models established.
2. Re-isolation of cancer cells from metastasis for transcriptomics, proteomics, metabolomics optimized
3. Inhibition of metastatic onset through chemical inhibition achieved: candidate drugs discovered
4. Inhibition of metastatic onset through genetic interference achieved: candidate gene targets discovered
5. Inhibition of metastatic onset through immunotherapy achieved: candidate antibodies selected

For this project

1. We aim to select 16 cell lines inducing reproducible cancer phenotypes in larvae until 8 dpf.
2. We aim to test 20 inhibitors, 40 siRNAs and 10 antibodies in larvae until 8 dpf and select promising candidates for validation in older larvae (Group II: 9-15 dpf).
3. We estimate to test 4 cell lines, 6 inhibitors, 6 siRNAs encapsulated in lipid nano particles (LNP) and 2 antibodies prioritized for anti-metastatic treatment in older larvae with more advanced tumors (Group II: 9-15 dpf).
4. We estimate to test 4 cell lines, 3 inhibitors and 4 LNP-siRNAs for validation of anti-metastatic efficacy in a juvenile (non-larvae) model with fully developed organs (Group III: up to 63 dpf).

See also figure 2 (below) for a more overall schematic design of the project.

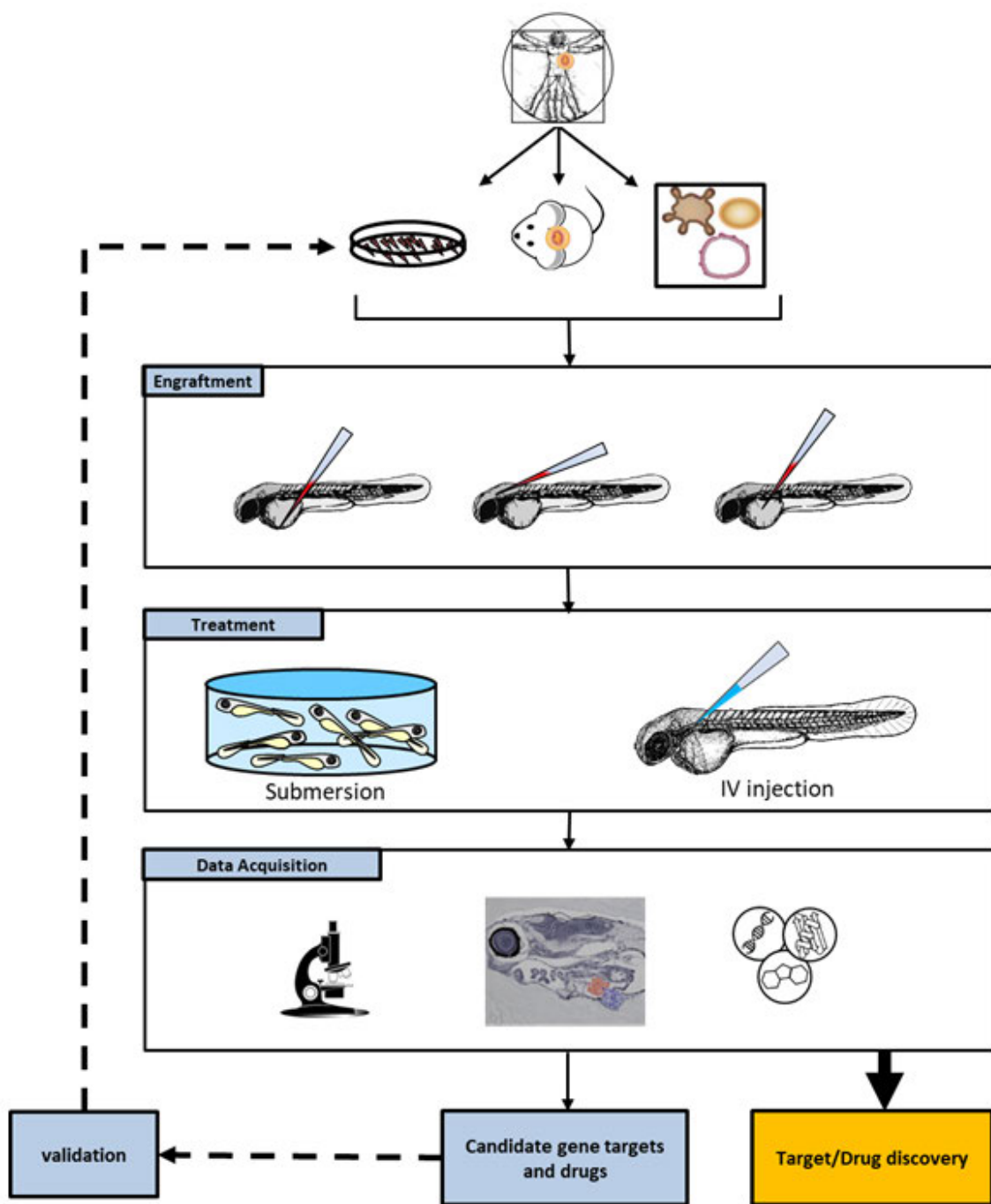


Figure 2. Translational cancer research in the zebrafish pipeline. Cancer cells from different origin (cell line, patient derived xenograft or organoid) are fluorescently labeled and injected into the zebrafish larvae at different positions at 2 dpf. Engrafted larvae treatment includes drug administration by submersion or by IV injection of dissolved or nanocarriers encapsulated drugs and LNP-Si-RNA or antibodies. Cancer phenotypes are monitored by fluorescent microscopy. In parallel samples are taken for histology and transcriptional analysis (or 'OMICS analysis). Candidates gene targets and drugs are selected and validated through different approaches in the zebrafish (shRNA against a drug target in the same cell line etc.) Prioritized targets will be subsequently selected for pre-clinical validation outside of this project.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Our project will only entail the experiments in zebrafish models and use minimal number of animals . All experiments will comply with internationally established principles of Replacement, Reduction and Refinement (**the international 3R principle**). To reduce number of animals and refine their discomfort we will integrate GO/NO GO decisions after each step of the project as indicated in the appendix. For example the selection of promising cell lines, optimization of engraftment procedure and initial toxicity test with drugs will be performed with larvae until 5 days post fertilization. We will select only promising xenograft models and drugs that can be tested without over toxicity. This pre-screen will allow selection of the optimal concentrations and delivery modality of drugs without toxic effects on the host and minimized usage of laboratory animals (larvae >5dpf) for more advanced drug screens. The duration of the animal experiment will be minimized in order to obtained pre-clinical relevant results. Most of the animal procedures described in this project and Appendix 1 were included in research proposals that were reviewed by independent experts in the field and granted for funding and approved in an earlier project (5.1 lid2h). After a license for this project will be obtained, all experiments for ongoing projects will formally be executed under this new license .

Success of integration of ZF xenograft models into drug and target discovery pipeline will reduce time and costs and accelerate pre-clinical discovery of new cancer treatments.

3.4.3 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	Drug and target discovery in zebrafish xenografts (submersion, IV injection, imaging, euthanasia)
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
1	Drug and target discovery in zebrafish xenografts

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Our experimental procedure is to inject fluorescent cells isolated from mice, zebrafish and human cancers into zebrafish wild type, fluorescent reporter or mutant larvae to generate new knowledge on basic cancer biology, which we will use for the development of compound and target discovery with potential clinical application. This procedure consists of multiple steps forming a coherent pipeline for drug and target discovery. The cancer phenotypes (cell migration, angiogenesis, proliferation, metastatic onset, interaction with host microenvironment) induced by engraftment of fluorescent cancer cells are microscopically examined. The relative tumor burden induced by wild type or genetically or chemically treated cells will be calculated by measuring of the integrated fluorescent density in the fish at different days post injection (dpi) and normalized with respect to the burden at 1dpi. Suitable genetic targets will be blocked with antibodies or can be modulated through immune reactions to inhibit or abrogate cancer growth or spread. In addition, IHC, transcriptomics and proteomics analysis of engrafted cells after genetic and chemical interference will identify a new genetic drug targets.

5.1 lid2h

This imaging based screening platform in zebrafish can rapidly determine the efficacy of either chemical inhibitors or genetic modification in cancer cells in an *in vivo* system and have potentially high translational value for patients (7).

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

Approximately 200-500 fluorescent cells of different incurable cancers (glioblastoma, osteosarcoma, cutaneous and eye melanoma, breast, prostate, bladder, colon, lung and pancreatic cancers) are injected at 2 days after fertilization of the eggs into the yolk sac, the duct of Cuvier, the perivitelline space, the brain cavity or behind the eye of the larvae using glass needle. During this manipulation the larvae are anaesthetized and show minimal signs of discomfort. The animals are observed daily and malformed larvae are removed and euthanized. The same procedure is used when engrafting cells into specific mutant zebrafish lines or reporter zebrafish lines related to cancer specific signaling pathways or organs, respectively. For treatments: either drugs are added to the water of the fish or intravenously injected into circulation in free or nanocarrier encapsulated form one day post engraftment of cancer cells (the level of expected discomfort is mild). The cancer cells are genetically modified prior to engraftment. The larvae stabilized/fixed in agar are imaged every 1st 4th and 6th day post injection (dpi) using a stereo fluorescent microscope. At the endpoint of the experiment the larvae are euthanized and used for either transcriptomics, IHC analysis or *ex vivo* propagation of tissue for subsequent re-enuftment (euthanasia, mild discomfort). When possible, the downstream analysis of the engrafted zebrafish will be combined (i.e. IHC or fluorescent cancer cell burden measurements and transcriptomics samples from the same group). For promising candidate gene targets and drugs, selected based on their efficacy on metastatic dissemination, angiogenesis and metastatic onset in zebrafish larvae until 8 days post fertilization (dpf) (Group I: 6-8dpf) after GO/NO GO decision experiments will be followed, including for additional 7 days to prove their effect on more progressed, metastatic tumors (Group II: 9-15 dpf) and finally validated in juvenile with developed organs to prove that results obtained in the larval stages are relevant for adult animals (Group III: up to 63 dpf) as requested for preclinical translation. From 8 dpf larvae and juvenile engrafted with cancer cells will be supplied with daily feedings.

For animal procedures we will subdivide the zebrafish in several age classes (**Group I: 5-8 dpf, Group II: 9-15 dpf and Group III: up to 63 dpf**).

The main body of the experimental procedures will be carried out on larvae of ages up to 5 days (no laboratory animals according to Directive 2010/63/EU for animals up to a maximum of 5 dpf). Based on the results obtained with the compounds or genetic interference strategies we will decide (GO/NO GO decisions) to validate anti-metastatic effects of treatments in the contacts of fully developed organs in older larvae and juvenile (Group II and III). The expected numbers of fish are outlined below.

Group I: 5-8 dpf

Inhibition of metastatic dissemination, angiogenesis, proliferation interaction with immune cells of the host and metastatic onset by:

Chemical inhibition:

Different cancer cell lines (16) will be engrafted into 2dpf larvae. At 1dpi engrafted larvae will be exposed in dissolved or nanocarrier-encapsulated form of 20 inhibitors/small molecules/drugs, which are prioritized based on their anti-proliferative efficacy on the same cancer cell lines *in vitro*. We will need two groups of larvae per experiment (inhibitor and vehicle control). The effects of treatment on the metastatic dissemination, proliferation, angiogenesis and interaction with immune cells of the host will be detected based on the analysis of multi-color, fluorescent images representing engrafted cancer cells, host vessels and immune cells at 0, 1, 3 days post treatment (dpt) of engrafted larvae. Automated image analysis have to be performed per group of larvae at 0, 1, 3 dpt. Due to the intrinsic biological variation (zebrafish are not inbred such as murine models) we have found based on the statistical analysis with the 25% reduction of cancer phenotype upon treatment, $p < 0.02$, 98% confidence interval and 80% power level that group sizes of 65 is required. In addition, this group will be enlarged by +/- 7% as this fraction of larvae dies or shows signs of discomfort during the experiment. In total 70 control and 70 treated larvae will be used in at least one or three biological repeats to obtain statistically significant reduction of cancer phenotypes upon treatment. In the course of this project we will verify a possibility to reduce number of larvae to yield significant differences between control and treated group.

- 20 inhibitors * 2 groups * 16 cell lines * 70 larvae = **44.800 larvae**

At 3 dpt (6dpf and 4dpi) the anti-cancer efficacy of 20 drugs will be evaluated and after **GO/NO GO** decision the experiments will be continued with selected promising cell lines and drugs until 5dpt (8dpf) to validate the effect of treatment on cancer cell extravasation from the circulation and metastatic onset.

shRNA interference:

Based on the anti-tumor efficacy of selected drugs the potential genetic pathways or targets will be predicted. Initial validation of the candidate genes will be performed *in vitro* based on their interference/knock down effects on cancer cell migration, proliferation and invasion. We plan to select 10 candidate genes for subsequent validation of their anti-tumor function in zebrafish model. To genetically disturb the gene of interest 3 shRNAs, which target different parts of the gene and 1 mock-scramble control constructs are required to justified specificity of the interference. The anti-cancer effect of disruption of 10 genes (40shRNA) in 12 cell lines will be detected by fluorescent imaging of control and cancer cells with genetically disrupt gene of interest at 1, 3 and 6 dpi in 70 engrafted larvae. Every experiment will be performed in at least one biological cohort. The effect of interference on metastatic dissemination, angiogenesis, proliferation and metastatic onset will be compared to scramble control, therefore only one experimental group per cell line is required.

- 40 shRNAs * 12 cell lines * 70 larvae = **33.600 larvae**

In addition, the interference of selected genes will be conducted by IV injection of 1 nL of shRNAs encapsulated into lipid nano particles (LNPs) at 1 and 3 dpi to block cancer or host genes responsible for cancer progression. We will select the 6 cell lines with the most robust phenotype in larvae based on **GO/NO GO** decision and test 40 LNPs-shRNAs on them. The anti-cancer efficacy of LNPs-shRNAs will be measured by fluorescent of engrafted cancer cells into larvae, which will be imaged individually at 0, 3, 5 dpt. To achieve statistical significant results every experiment will be performed in three cohorts with in total 70 larvae.

- 40 LNPs-shRNAs * 6 cell lines * 70 larvae = **16.800 larvae**

Immunotherapy:

When selected genetic targets are suitable to be blocked with antibodies (ABs) or can be modulated through immune reactions we will use antibody based immunotherapy to inhibit or abrogate cancer growth or spread in larvae until 8dpf. ABs will be injected into circulation of larvae in free or encapsulated form at 1dpi (2 conditions of treatment). The anti-cancer efficacy of ABs will be measured by fluorescent of engrafted cancer cells into 70 larvae, which will be imaged individually at 0, 3, 5 dpt.

We will select the 6 cell lines with the most robust phenotype in larvae based on **GO/NO GO** decision and test 10 antibodies on them. To achieve statistical significant results every experiment will be performed in three cohorts.

- 10 ABs * 2 groups * 6 cell lines * 2 treatments * 70 larvae = **16.800 larvae**

RNA isolation for transcriptomic analysis:

To identify genetic targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies we will apply the transcriptomic analysis of cancer cells in culture versus cells forming experimental metastasis in the engrafted larvae. For single cell RNA sequencing (scRNAseq) 10.000 cells per condition are needed for statistics, therefore the required cancer cells will be isolated from 100 engrafted larvae at 0 dpt and 5 dpt per condition. We want to test 3 conditions per cell line (untreated control and after shRNA/ chemical inhibition of target gene) comparing two time points. Three biological replicas are necessary for the statistical analysis of transcriptomics results. Using this methodology we will test 6 cell lines.

- 6 cell lines * 100 larvae per RNA isolation * 3 conditions * 2 time points * 3 cohorts = **10.800 larvae**

Total number of larvae in group I = 122.800 larvae

This point functions as a GO/NO GO step, only 4 cell lines inducing reproducible cancer phenotypes, 6 inhibitors, 12 shRNA-LNPs and 2 Abs selected in this group based on their potential to inhibit one of the cancer phenotypes induced by engrafted cells will be validated in older age groups.

Group II: 9-15 dpf

Inhibition of metastasis by:

Chemical inhibition:

On the basis of highly promising results in the larval model (**GO/NO GO decision**) we will follow up the effects of treatments in the later larval model (9dpf=7dpi=6dpt and 15 dpf=13dpi=12dpt). We will start with using 4 cell lines validated in earlier time points to micro-metastasize and induce blood vessel outgrowth. This prolonged experimental setup will be used as a validation step for chemical inhibitors found in group I at 6 and 12dpt. For each experimental condition 70 larvae for treatment and 70 control larvae are required.

- 6 inhibitors * 4 cell lines * 70 larvae * 2 time points = **3.360 larvae**

shRNA interference:

- 12 LNPs-shRNAs * 4 cell lines * 70 larvae = **3.360 larvae**

Inhibition of metastasis through immunotherapy:

We will test 2 antibodies on the 4 most promising cell lines (**GO/NO GO decision**) at two time points.

- 2 antibodies * 4 cell lines * 70 larvae * 2 time points = **1.120 larvae**

RNA isolation for transcriptomic analysis:

To identify genetic targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies we will apply the single cells transcriptomic analysis of cancer cells in culture versus cells forming experimental metastasis in the engrafted larvae. For scRNAseq 10.000 cancer cells per condition are needed for statistics, therefore the required cancer cells will be isolated from 100 engrafted larvae at 6dpt and 12dpt per condition. We want to test 3 conditions per cell line (untreated control and after shRNA/ chemical inhibition of target gene) comparing two time points. Three biological repeats are necessary for the statistical analysis of transcriptomics results. Using this methodology we will test 6 cell lines.

- 6 cell lines * 100 larvae per RNA isolation * 3 conditions * 2 time points * 3 cohorts = **10.800 larvae**

Total number of larvae in group II = 18.640 larvae

Group III (up to 63 dpf):

To validate our findings obtained in Group II in a juvenile (non-larval) model we will select 4 most promising cell lines, 1 target gene and 3 inhibitors (**GO/NO GO decision**). For this validation we will keep the number of animals to an absolute minimum. The anti-cancer efficacy of treatment in untreated vs treated fish (2 conditions) will be analyzed based on the alterations of metastatic spread, angiogenesis and proliferation; furthermore samples will be taken for histological analysis.

Histological analysis:

We never performed histological analysis on the 63dpf juveniles engrafted with cancer cells therefore a power calculation is not possible.

Based on our published histological and immunohistochemical analysis on the 35dpf juveniles engrafted with Ewing sarcoma cells (21) we estimate that at 63dpf 5 juvenile for control and 5 juveniles for treated group are sufficient for the histological analysis. In addition, this group will be enlarged by 2 extra individuals to correct for possible dropout during this experiment.

- 4 cell lines * 7 fish per group * 2 conditions = **56 juvenile**

shRNA interference:

To validate the anti-cancer efficacy obtained by the genetic inference of one possible gene target we have to provide results of two biological repeats (2 cohorts). For analysis we will compare untreated and treated juveniles (2 conditions).

- 4 LNPs-shRNAs * 4 cell lines * 7 fish per group * 2 conditions * 2 cohorts = **448 juvenile**

Chemical inhibition:

To validate the anti-cancer efficacy obtained by the chemical inhibition we have to provide results of two biological repeats (2 cohorts). For analysis we will compare untreated and treated juveniles (2 conditions).

- 3 inhibitors * 4 cell lines * 7 fish per group * 2 conditions * 2 cohorts = **336 juvenile**

Total number of fish in group III = 840 fish

Total number of animals required:

Group I = 122.800 larvae from 5-8 days

Group II = 18.640 larvae from 9-15 days

Group III = 840 juvenile up to 63 days

Total: 142.280

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

Based on the power analysis we have found that in general 70 larvae per experimental group (including 7% lost during experiment) are required for the robust generation of statistically significant and publishable results in larvae until 15dpf. The number of animals is estimated with LaMorte Power Calculation and t-test analysis.

Sample size = $(sd \text{ control group})^2 + (sd \text{ experimental group})^2 * Z / (\text{mean control group} - \text{mean experimental group})^2$

With input parameters based on the previous results:

- sd: 45
- Minimal detectable effect size: 25% decrease
- Control mean: 100 (total fluorescence per larvae divided by fluorescent area)
- Experimental mean: 75 (total fluorescence per larvae divided by fluorescent area)
- 98% confidence interval and 80% power level

we found that to obtain high statistical power of the results with $p < 0.02$ between control and treated group the group size of approximately 65 larvae until 15 dpf (Gr I and Gr II) is needed. In addition, this group will be enlarged by +/- 7% as this fraction of larvae dies or shows signs of discomfort during the experiment. The result of these experiments will be statistically tested through a Fischer's exact test, ANOVA or student t-test. In the course of this project we will verify a possibility to reduce number of larvae per group to yield significant differences between control and treated group. In addition, imaging of the same larva during the treatment will be applied if possible to minimise the number of animals.

- In general (based on the cancer type) only 5% of the larvae die due to mechanical damage during the engraftment procedure, subsequently only a minor fraction of the population (7%) dies during the experiment (largely dependent on the type of experiment and the aggressiveness of the cancer cells used).

Different *ex vivo* analysis techniques require different handling of the extracted tissue (e.g. cryo-sectioning or paraffin embedding). To reduce the number of animals that are required we will combine *ex vivo* assays for different parameters as much as possible.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Zebra fish (<i>Danio Rerio</i>)	Internal breeding	Larvae and juvenile	142.280	m/f	No	AB/TL

Provide justifications for these choices

- Zebrafish (*Danio rerio*) is quickly becoming a widely accepted cancer model, its optical transparency and high fecundity allow for high quality optical analysis of cancer progression up to single cell level in a semi-high throughput fashion.
- The zebrafish used are bred at our institution.
- Preliminary screens (both toxicity assays and optimizations of engraftment) will be performed in animals up to 5 days post fertilization, reducing the numbers of animals used for the final treatment strategies. All fish are monitored at least every other day for welfare status and euthanized immediately if any adverse effect occurs.

Species	<i>Danio Rerio</i>
Origin	Internal breeding at 5.1 lid2h
Life stages	Larvae and juvenile
Number	142.280
Gender	m/f
Genetic alterations	Yes, several lineage specific fluorescent reporter lines (e.g. vasculature, immune cells), mutant lines.
Strain	AB/TL

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

Animals are anaesthetised during the experiments. When symptoms of disease are observed humane endpoints will be applied.

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

In our experiments <7% of larvae die or show signs of discomfort 6-8 days post fertilization (dpf), therefore experiments will be initiated with 70 larvae to obtain results from at least 65 larvae for statistical analysis (70-7%~65). Animals showing signs of discomfort (physiological malformation or lack of response to lateral line stimulation) will be removed from the experiment. After 8dpf and 6 days post injection (dpi) increase

discomfort of animals may emerge. Animals showing locomotor abnormality (hypo or hyper activity, inactivity, twitching movements, swimming in circle), failure to feed or grow will be euthanized.

Explain why these effects may emerge.

The cancer engraftment introduces a relatively high number of cancer cells (which are required for the establishment of a robust cancer phenotype) into the zebrafish larvae, this can in some cases lead to an obstruction or perturbation of normal biological processes (perturbed liver function after liver invasion etc.). These adverse effects are intrinsic to cancer metastasis and cannot be avoided, although through thorough screening (in larvae up to 5dpf) and titration of the amount of cancer cells for engraftment we will keep the adverse effects to a minimum.

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

For very aggressive cells we will titrate the amount of cells, enabling us to prevent severe discomfort (within the timeframe of the experiment). The animals will be checked every other day and euthanized immediately if any adverse effect occurs.

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

The animals will be checked every other day for signs of general discomfort (as good as is possible in zebrafish larvae) and discomfort (e.g. aberrant physiology, lack of movement). Humane endpoints for group I are lack of response to lateral line stimulus and gross malformation for group II and III the same humane endpoint apply but are extended by cachexia (which is impossible to determine in larvae up to 8 days old). Humane endpoint is reached when the food uptake of the zebrafish is affected due to weakness and wasting of the body. When animals reach the humane endpoints they will be removed from the experiment.

Indicate the likely incidence.

Expected in <5%; maximally moderate discomfort no longer than 1 day.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

During the engraftment procedure the larvae are anesthetized. Within 30 minutes (after the anesthetic has worn off) the fish behave as normal, <5% of all larvae die during the engraftment. A schematic overview of the expected discomfort levels is provided in table 1. The level of discomfort is related to the progress of tumor growth. We expect that all animal that are injected with cancer cells experience mild discomfort. Although it is impossible to observe discomfort in the early stages of zebrafish development (2-3 weeks old). Expansion of tumor development can possibly induce malformation and abnormal swim behavior. This is considered to be moderate discomfort.

Table 1: Overview of expected discomfort in all zebrafish larvae experimental groups.

Description	Animal species/strain and sex	Number of animals	Discomfort (expected cumulative discomfort)	Discomfort is a sum of the following listed procedures:
-------------	-------------------------------	-------------------	---	---

Group I	5-8 days old zebrafish M/F	93%: 114.204	Mild	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (mild)
		7%: 8.596	Moderate	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (moderate)
Number (Group I)		122.800		
Number (Group II)		18.640		
Group III	9-15 days old zebrafish M/F	70%: 13.048	Mild	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (mild)
		30%: 5.592	Moderate	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (moderate)
Number (Group III)		840		
	Up to 63 days old zebrafish M/F	20%:168	Mild	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (mild)
		80%: 672	Moderate	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (moderate)
Total number		142.280		

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement	<p>Metastasis is a complex multistep process where cancer cells not only modulate their own intrinsic properties based on the surroundings, but also must overcome multiple challenges to be able to successfully form a metastatic outgrowth. Currently there are no <i>in vitro</i> replacements that can mimic the complex interactions that cancer cell undergo during metastasis, although many of the preliminary screens will be performed in zebrafish larvae of up to 5 days before validating previous experimental approaches in older animals.</p> <p>In addition, the candidate genes and drugs to be used in the zebrafish models will be initially selected <i>in vitro</i> based of their effects on cancer cell migration and proliferation.</p>
Reduction	<p><i>Ex vivo</i> assays will be combined as much as possible to reduce the number of animals that are required.</p> <p>To reduce number of animals and refine their discomfort we will integrate GO/NO GO decisions after each step of the project. For example the selection of promising cell</p>

	lines, optimization of engraftment procedure and initial toxicity test with drugs will be performed with larvae until 5-6 days post fertilization. We will select only promising xenograft models and drugs that can be tested without over toxicity. This pre-screen will allow selection of the optimal concentrations and delivery modality of drugs without toxic effects on the host and minimalized usage of laboratory animals for more advanced drug screens. The duration of the animal experiment will be minimalized in order to obtain pre-clinical relevant results.
Refinement	Animals will be anaesthetized during engraftment to reduce the level of discomfort of the treatment.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

The proposed procedure is for fundamental and translational research, it does not consist of legally required research.

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Animals will be killed for *ex vivo* analysis.

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

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

The zebrafish will be killed using an overdose of the anesthetic Tricaine (this method is described in Annex IV of Directive 2010/63/EU) or by cooling as recently described (*Biology* **2022**, 11(4), 546; <https://doi.org/10.3390/biology11040546>). The rapid cooling method faster time to death and fewer signs of distress in euthanized zebrafish, we advocate this method as a humane veterinary practice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Format Niet technische samenvatting

Let op: bij gebruik van dit word-format dient uiteindelijk alsnog het Excel-format te worden ingevuld voordat uw aanvraag vergund kan worden (zie Procesbeschrijving word-document NTS).

Please fill this form out in Dutch. Dit formulier moet ingevuld worden in het Nederlands.

=>Let op de richtlijn is ~500 woorden in totaal<=

Link naar EU Guidance document: [Working document on Non-Technical Project summaries](#)

Link naar CCD toelichting: [Toelichting bij de formulieren projectaanvraag](#)

Tab NTS

Country	NL
Language	NL
EU submission	<input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no
Title of the project	De zebravis als model voor ontdekking van nieuwe behandelingen tegen kanker
NTS identifier	Deze wordt door de CCD ingevuld
NTS national identifier	Deze wordt door EC ingevuld
Duration of the project	60 (in months) 01-01-2023 t/m 31-12-2027
Keywords/Trefwoorden	
Keyword 1	Kankerbestrijding
Keyword 2	Kankercellen
Keyword 3	Veelvuldig testen van nieuwe medicijnen
Keyword 4	Genetische modificatie
Keyword 5	Kankercel-immuuncel interactie

Purpose(s) of the project
Objectives of the project/ Doel van het project
<i>Describe the objectives of the project (for example, addressing certain scientific unknowns, of scientific or clinical needs). Compulsory! Maximum length is 2500 characters</i>
<p>De zebravis wordt de laatste jaren steeds meer gebruikt als model voor kankeronderzoek. Doordat zebravistumoren veel overeenkomsten vertonen met de mens in hun DNA en cel-eigenschappen is de zebravis een geschikt modelorganisme voor een groot aantal menselijke soorten kanker. Zebravislarven zijn doorzichtig en ontwikkelen zich buiten de moeder wat ze zeer geschikt maakt voor onderzoek. Zo kan in zebravissen de ontwikkeling van uitzaaiingen en de reactie van cellen van het immuunsysteem op tumorcellen in beeld gebracht worden. De combinatie van beschikbaarheid van fluorescente zebravislijnen en gemakkelijke opname van chemicaliën uit het water, zorgt ervoor dat in dit model in een korte tijd fundamentele kennis vergaard kan worden.</p> <p>Wij hebben de afgelopen jaren zebravismodellen ontwikkeld om op grote schaal tumorgedrag te bestuderen en tumoren te beoordelen op gevoeligheid voor geneesmiddelen. Met behulp van deze modellen hebben we essentiële genen geïdentificeerd die betrokken zijn bij het ontstaan van bijvoorbeeld prostaatkanker, botkanker en oogmelanomen. Dit project is een voortzetting van onze huidige onderzoekslijn.</p> <p>Het doel van dit project is het ontwikkelen van nieuwe behandelingen tegen kanker door gebruik te maken van het zebravismodel. Door de fundamentele mechanismen te bestuderen van de migratie van kankercellen, biologie van primaire uitzaaiingen en de interactie tussen kankercellen en de gastheer, kan richting worden gegeven aan nieuwe kankercel- en gastheergerichte therapieën met potentiële klinische toepassing.</p> <p>De specifieke doelstellingen van de aanvraag zijn:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) De zichtbaarheid van het gedrag van de tumorcellen en de gastheer verbeteren om zo tumorgroei, bloedvat ingroei, tumorverspreiding en de afweerreactie beter te begrijpen. 2) In kaart brengen welke genen en chemicaliën invloed hebben op tumorontwikkeling door verschillende genen in tumorcellen uit te schakelen en door zebravislarven bloot te stellen aan verschillende chemicaliën.

- 3) Bevestigen dat geïnjecteerde menselijke tumorcellen kunnen verspreiden naar de organen van zebravissen, en dat tumorontwikkeling geremd kan worden door in te grijpen met chemische stoffen en uitschakeling van specifieke genen.

Potential benefits likely to derive from this project/ Mogelijke opbrengsten van het project

What are the potential benefits likely to derive from this project? Explain how science could be advanced, or humans, animals or environment may ultimately benefit from the projects. Where applicable, differentiate between short-term benefits (within the duration of the project) and long-term benefits (which may accrue after the project is finished). Compulsory! Maximum length is 2500 characters

In dit project wordt het zebravismodel gebruikt om meer inzicht te krijgen in zowel de moleculaire mechanismen van tumorgroei als tumorremming door nieuwe medicijnen/chemicaliën, waarmee de basiskennis over kankerprocessen wordt vergaard. Een beter begrip hiervan is belangrijk om aanknopingspunten te vinden voor nieuwe behandelingsstrategieën. Kennisoverdracht en kennisbenutting wordt bevorderd door verschillende samenwerkingsverbanden.

Predicted harms

In what procedures will the animals typically be used/ Welke handelingen ondergaan de dieren?

In what procedures will the animals typically be used (for example, injections, surgical procedures)? Indicate the number and duration of these procedures. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Injectie

Zebravislarven van 2 dagen oud worden verdoofd door ze in een kweekschaal te plaatsen met daarin water met opgelost verdovingsmiddel. Kankercellen of kanker-geassocieerde cellen worden geïnjecteerd in de dooier, de bloedbaan of de hersenholte van de larven. Deze techniek wordt micro-injectie genoemd en wordt uitgevoerd met behulp van een microscoop en een kleine glazen naald. Vervolgens worden de larven teruggeplaatst in een kweekschaal met vers water om te herstellen van de verdoving.

Om genen te onderzoeken die invloed hebben op kankerontwikkeling wordt het DNA van kankercellen aangepast in het laboratorium en vervolgens worden deze cellen door middel van micro-injectie in de zebravislarven gebracht wanneer deze 4 dagen oud zijn. Ook worden antilichamen toegediend aan de bloedsomloop van larven die eiwitten remmen die betrokken zijn bij kankerontwikkeling.

Blootstelling aan chemicaliën

Na het injecteren van kankercellen wordt een deel van de larven blootgesteld aan tumorremmende chemicaliën. De larven worden, op dezelfde wijze als hierboven beschreven, onder verdoving gebracht. De chemicaliën worden direct toegediend aan het water in de kweekschaal of ze worden verpakt als nanodeeltjes (liposomen) en in de bloedbaan geïnjecteerd.

Imaging

De ontwikkeling van kanker in de zebravislarven en de effecten van de verschillende ingrepen wordt bestudeerd in levende zebravislarven door ze in detail met de microscoop te bekijken. Hiertoe worden de zebravislarven op verschillende tijdstippen (tot 15 dagen na fertilisatie) gefixeerd en verdoofd in een kweekschaal en onder de microscoop bekeken. Na bestudering worden de larven teruggeplaatst in een kweekschaal om te herstellen van de verdoving.

Euthanasie

Het experiment wordt beëindigd door het euthanaseren van de zebravissen ten behoeve van *ex vivo* analyses of omdat het humane eindpunt is bereikt.

Expected impacts/adverse effects on the animals/ Welk ongerief ondergaan de dieren en geef daarbij de verwachte ongeriefsclassificatie (terminaal, licht, matig of ernstig) aan.

What are the expected impacts/adverse effects on the animals for example pain, weight loss, inactivity/reduced mobility, stress, abnormal behaviour, and the duration of those effects? Compulsory! Maximum length is 2500 characters

De zebravislarven ondervinden mogelijk licht ongerief van verdoving en injectie. Bij een aantal dieren kunnen zeer snelgroeende kankercellen leiden tot matig ongerief. Op grond van onze ervaring verwachten we dit bij niet meer dan 15% van alle dieren. Waarneembare ziektesymptomen zullen zich niet langer dan één dag voordoen wegens inspectie om de dag en tijdige euthanasie.

Basic Research: Oncology [PB1]

Translational and applied research: Human Cancer [PT21]

Choose a purpose

Choose a purpose

Choose a purpose

Tab Expected harms

What species and numbers of animals are expected to be used? What are the expected severities and the numbers of animals in each severity category (per species)?

Estimated numbers per severity				
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>				
Species	Non-recovery	Mild	Moderate	Severe
Zebra fish (Danio rerio) [A34]	0	127.420	14.860	0
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				
Choose a species				

Tab Fate of animals kept alive

What will happen to the animals kept alive at the end of the procedure?

Estimated numbers per severity			
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>			
Species	Reused	Returned	Rehomed
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			



Advies aan CCD

Datum 27 december 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216495

Instelling: 5.1 lid2h
 Onderzoeker: 5.1 lid2e
 Project: Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model.
 Aanvraagnummer: AVD202216495
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek
 Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

Proces	
	<p>- In het projectvoorstel verwijst u naar eerder behaalde resultaten onder 5.1 lid2h. Kunt u iets toelichten over de in dit project behaalde resultaten en hoe deze zich verhouden tot de aanvraag die u nu heeft ingediend?</p> <p>- In de bijlage dierproeven onder F geeft u het ongerief per handeling en per experimentele groep weer. Kunt u nog samenvatten welke percentages per ongeriefcategorie gelden voor de bijlage als geheel?</p> <p>- In de bijlage geeft u onder "verfijning" weer dat er anesthesie wordt toegepast. Neemt u nog andere maatregelen om te zorgen dat de dierproeven zo verfijnd mogelijk verlopen?</p> <p>Over de NTS:</p> <p>- U gebruikt de term euthanasie. De CCD vindt dat het woord "doden" en beter beeld geeft van wat er met de dieren gebeurt. Kunt u de term vervangen?</p> <p>- Er komt in de NTS vakjargon voor en ingewikkelde termen als "ex vivo", "in vitro" en "preklinische resultaten". Kunt u de tekst nog een keer doorlopen en moeilijke termen vervangen of uitleggen?</p> <p>- Onder "verfijning" vermeldt u dat dieren "uit het experiment gehaald worden". Het lot van deze dieren zal voor een algemeen publiek wellicht niet duidelijk zijn. Kunt u benoemen dat deze dieren gedood worden?</p>

	- Kunt u de wijzigingen direct doorvoeren in het verplicht gestelde Excel format en deze bij ons indienen?			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts				
	Zebravissen (Danio rerio)		142.280	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts

Zebravissen (Danio rerio) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>C1 (samenhang en toetsbaarheid): (...) Het is helder welke handelingen en interventies individuele dieren zullen ondergaan echter het is voor de DEC leden niet goed mogelijk om in te schatten welk ongerief de vissenlarven van de interventies zullen gaan ondervinden. Er is een kennislacune met betrekking tot de daadwerkelijke gevolgen voor de (fysiologie) van ZF larven als er XPD tumorcellen worden ingebracht die uitgroeien tot tumor achtige structuren. Vooral nog kunnen de meeste DEC leden (6 van de 7), vooral gezien de lange ervaring van de aanvragers met ZF onderzoek, wel 'leven met' de ongeriefclassificatie zoals gegeven door de aanvrager. Het is voor de DEC leden wel duidelijk dat het gebruik van ZF larven veel voordelen biedt voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen.(...)</p> <p>C9 (bijzondere categorieën): (...) De vissen zullen worden gedood volgens de richtlijn 2010/63/EU of dmv een snelle afkoelmethode. Dit is naar inziens van de DEC voldoende onderbouwd.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: 1. Rechtvaardigt het onderzoek in zebravisslarven naar pathobiologische aspecten van tumor ontwikkeling en – metastasering en naar</p>
-------------------	---

Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD_1_5.1 lid2h.pdf

Pagina: 2

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2h Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 10:26:11 +01'00'

Ik zou dit stuk uit C1 er ook nog bij plakken:

(...) De meerderheid van de DEC is ervan overtuigd dat op zorgvuldige wijze, met behulp van heldere go/no-go momenten, de voortgang van het project beoordeeld wordt waardoor er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Eén lid is van mening dat er geen heldere go/no-go momenten zijn; zie het minderheidsstandpunt. (...)

therapeutische aangrijpingspunten met als uiteindelijk doel het opsporen van moleculaire of genetisch targets om deze tumorprocessen te kunnen blokkeren de inzet en het doden van 142.280 zebrawislarven en het cumulatief licht tot matig ongerief dat de dieren wordt aangedaan?

2. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling: het bestuderen van de pathobiologie (tumor initiatie, - differentiatie, - infiltratie en - metastasering) van humane tumorcellen in zebrawis larven. De doelstelling is om in dit zebrawis model waarin humane tumorcellen worden ingespoten (xenograft) nieuwe medicamenten te testen op hun werkzaamheid.

Waarden die voor proefdieren, de zebrawis larven, in het geding zijn: het proefdieronderzoek is nadelig voor de larven als gevolg van het, te verwachten, licht tot matige ongerief, het gedood worden en de aantasting van de fysieke integriteit van het dier.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel door het vergaren van nieuwe inzichten en onderzoeksresultaten, die waarschijnlijk gepubliceerd kunnen worden.

Waarden die voor de kanker patiënten bevorderd worden: een mogelijk groot voordeel omdat de informatie die verkregen wordt in de toekomst van waarde kan zijn voor de ontwikkeling van therapeutische strategieën die de progressie van kanker en de daaraan gerelateerde metastasering van tumorcellen kunnen verminderen.

De meerderheid van de DEC is van mening dat de belangen van de samenleving en die van huidige of toekomstige kanker patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.

Het is evident dat er behoefte is aan nieuwe effectieve kankerbehandelingen die tumor - en patiënt specifiek zijn. Dit voorgestelde onderzoek kan daaraan gaan bijdragen. De DEC acht de voorgestelde onderzoeken in zebrawis larven van essentieel belang om inzicht te krijgen in de moleculaire mechanismen van tumorontwikkeling en om nieuwe therapeutisch targets te kunnen identificeren. Hiertoe zullen zebrawis larven worden gebruikt. De DEC is van mening dat dit onderzoek niet proefdiervrij kan worden uitgevoerd en vind dat de inzet van 142.280 zebrawis larven en het ongerief dat de dieren zullen ondergaan voor dit onderzoek gerechtvaardigd is.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De meerderheid van de DEC is van mening dat de waarden die voor de uiteindelijke doelgroep, de patiënten met kanker, bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten

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

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat minderheidsstandpunt: Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Een van de DEC leden geeft een negatief advies. "De hoofdreden om tegen dit onderzoek te zijn is de enorme hoeveelheid dieren die men aanvraagt, terwijl tegenover die hoeveelheid dieren géén hele lage hoeveel ongerief per dier staat. Hieronder geef ik mijn argumentatie in meer detail.

Dat er zoveel dieren aangevraagd worden, heeft er niet alleen mee te maken dat zebravissen een grotere genetische diversiteit vertonen dan bijvoorbeeld muizen die als proefdieren worden gebruikt. De hoeveelheid aangevraagde proefdieren is ook zo hoog omdat het onderzoek heel breed is opgezet. Zoals in de laatste alinea van het project proposal staat samengevat, is men is van plan maar liefst vier typen kankercellen, 20 inhibitors, 40 siRNAs en 10 antilichamen te testen. De zebravis wordt door de onderzoekers als 'high-throughput' model gepresenteerd om al deze (waarden van) variabelen te kunnen testen, en dit is blijkens het antwoord op onze vraag 2 de hoofdreden om voor zebravissenonderzoek te kiezen. Het doen van veel dierproeven op veel dieren is daarmee inherent aan de onderzoeksstrategie, en dat staat op gespannen voet met de ambitie om minder proefdieren te gebruiken.

Een hoofdargument dat de onderzoekers geven om zoveel dierproeven te willen doen is dat ze 'personalized medicine' willen bevorderen. Door zoveel (waarden van) variabelen te onderzoeken, is klaarblijkelijk het idee, kan voor een individuele patiënt worden gekeken op welke onderzoekssituatie zijn of haar toestand het meest lijkt en kan zo de therapie worden bepaald. Zo ingevuld stimuleert het ideaal van 'personalized medicine' het gebruik van veel proefdieren en staat het haaks op de genoemde ambitie om het aantal dierproeven te

verminderen (die mijns inziens samenhangt met de erkenning van de intrinsieke waarde van proefdieren).

Het is hier overigens ook van belang dat de go/no-go momenten, zoals ze nu geformuleerd zijn, geen mogelijkheid bieden om het aantal proefdieren te verminderen. Ze dienen niet om te bepalen hoeveel waarden er van bepaalde variabelen worden getoetst, maar alleen welke; het aantal waarden dat getest gaat worden ligt vast. Bij de eerste zogenoemde go/no-go beslissing (zie appendix pagina 3) staat bijvoorbeeld al vast dat er 6 cellijnen en 40 LNPs-shRNAs getest zullen worden en wordt alleen een keuze voor specifieke cellijnen en LNPs-shRNAs gemaakt.

Nergens in het onderzoeksvorstel of één van de andere documenten wordt beargumenteerd of aannemelijk gemaakt dat zebravislarven bijzonder weinig ongerief van het onderzoek zouden ondervinden. Het aantal dieren dat 'mild' ongerief zal ondervinden wordt op 127,420 ingeschat en het aantal dat 'matig' ongerief zal vinden op 14,860; er is geen sprake van dat 'mild' en 'matig' ongerief voor een zebravislarve iets heel anders zou inhouden dan voor muizen. Gezien de enorme aantallen dieren mag niet te lichtvaardig worden aangenomen dat het met het pijn of lijden van zebravissen wel mee zal vallen, als we dat niet goed weten. Daarnaast is twijfelachtig of het gebruiken en doden van proefdieren op zich ethisch neutraal is, zelfs als alles pijnloos gebeurt. Ook vanuit dat oogpunt is het grote aantal dieren dat is aangevraagd problematisch. Ik kan me moeilijk voorstellen dat een onderzoek met soortgelijke aantallen muizen positief ontvangen zou worden, en het mag niet zo zijn dat de belangen van zebravissen dan wel zebravislarven minder meegeteld worden dan die van muizen zolang daar geen goede inhoudelijke redenen voor gegeven worden. Die redenen heb ik noch in de aanvraag noch in de bespreking van de DEC voorbij horen komen. Er was bij de DEC wel sprake van een gevoel dat zebravissen er toch minder toe deden (al dan niet omdat hun vermogen tot lijden volgens de persoonlijke inschatting van de spreker beperkt zou zijn), maar de onderbouwing daarvan was zeer beperkt. Naar mijn idee wordt er dus zonder goede gronden een onderscheid gemaakt op basis van soort en dat vind ik ethisch problematisch.

Hoewel ik het onderzoek zeker een substantieel belang toeken – het betreft ernstige aandoeningen die veel voorkomen en ik geloof best dat het nieuwe inzichten en betere behandelmethoden kan opleveren – geef ik om de bovengenoemde redenen een negatief advies. De aanvragers hadden mijn inziens genoeglijk moeten aantonen dat zebravislarven een zeer beperkt vermogen om te lijden hebben, óf het onderzoek veel minder breed en met inbegrip van goede go/no-go criteria moeten opzetten, zodat er niet zo ontzettend veel dieren nodig zouden zijn.”

	De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC: Citaat: Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen duidelijke dilemma's naar voren gekomen. Wel is het voor de DEC leden niet goed mogelijk om in te schatten welk ongerief de vissenlarven van de interventies zullen gaan ondervinden.
--	---

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
Het DEC advies is helder en volledig. Er is 1p heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die zijn gesteld. Bij de onderbouwing van de C vragen gebruikt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op een logische manier uit de antwoorden op de C vragen.	
Het minderheidsstandpunt is helder weergegeven en goed uiteengezet.	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen- verstrengeling	5.1 lid 2e
-------------------------------------	------------


3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.
--

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Dodens volgens richtlijn?
3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts	Ja	niet volgens de richtlijn. Citaat: The zebrafish will be killed using an overdose of the anesthetic Tricaine (this method is described in Annex IV of Directive 2010/63/EU) or by cooling as recently described (Biology 2022, 11(4), 546; https://doi.org/10.3390/biology11040546). The rapid cooling method faster time to death and fewer signs of distress in euthanized zebrafish, we advocate this method as a humane veterinary practice.

Er is inzicht gegeven... We hebben alleen de strekking van de gestelde vragen.

Naam proef		
3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts		
Zebravissen (Danio rerio)	Ongerief: 10,4% Matig 89,6% Licht	 1

5 Samenvatting

5.2 lid 1

De aanvraag is een voortzetting van **5.1 lid 2h**. De aanvrager is gevraagd om wat meer toelichting te geven over in dit voorgaande project behaalde resultaten.

Zebravissen en larven worden gedood door overdosis anestheticum of door koeling. Deze laatste methode staat niet in de richtlijn beschreven maar is wel een gangbare methode voor de doding van zebrevissen. De instelling heeft een ontheffing van de NVWA om deze methode te gebruiken. De DEC en het

5.2 lid 1

Eén van de DEC leden heeft een minderheidsstandpunt ingenomen (zie DEC advies). Deze persoon heeft voornamelijk moeite met de brede opzet, het groot aantal dieren dat wordt aangevraagd en het ongerief dat de dieren ondervinden. Daarbij wordt het als ethisch problematisch ervaren dat er onderscheid wordt gemaakt op basis van soort (een vis is kennelijk minder waard dan een muis).


6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid 1


De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Pagina: 7

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2h Onderwerp: Notitie Datum: 28-12-2022 10:12:33 +01'00'

Dit komt overeen met de NTS, de bijlage dierproeven heb ik niet uitgerekend.

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2h Onderwerp: Markering Datum: 28-12-2022 10:05:57 +01'00'

Is het ongerief voor jou duidelijk?



Advies aan CCD

Datum 28 december 2022

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216495

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model.
Aanvraagnummer: AVD202216495
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

Proces	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <ul style="list-style-type: none">- In het projectvoorstel verwijst u naar eerder behaalde resultaten onder 5.1 lid2h. Kunt u iets toelichten over de in dit project behaalde resultaten en hoe deze zich verhouden tot de aanvraag die u nu heeft ingediend?- In de bijlage dierproeven onder F geeft u het ongerief per handeling en per experimentele groep weer. Kunt u nog samenvatten welke percentages per ongeriefcategorie gelden voor de bijlage als geheel?- In de bijlage geeft u onder "verfijning" weer dat er anesthesie wordt toegepast. Neemt u nog andere maatregelen om te zorgen dat de dierproeven zo verfijnd mogelijk verlopen? <p>Over de NTS:</p> <ul style="list-style-type: none">- U gebruikt de term euthanasie. De CCD vindt dat het woord "doden" en beter beeld geeft van wat er met de dieren gebeurt. Kunt u de term vervangen?- Er komt in de NTS vakjargon voor en ingewikkelde termen als "ex vivo", "in vitro" en "preklinische resultaten". Kunt u de tekst nog een keer doorlopen en moeilijke termen vervangen of uitleggen?- Onder "verfijning" vermeldt u dat dieren "uit het experiment gehaald worden". Het lot van deze dieren zal voor een algemeen publiek wellicht
---------------	--

	niet duidelijk zijn. Kunt u benoemen dat deze dieren gedood worden?			
	- Kunt u de wijzigingen direct doorvoeren in het verplicht gestelde Excel format en deze bij ons indienen?			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts				
	Zebravissen (Danio rerio)		142.280	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts

Zebravissen (Danio rerio) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>C1 (samenhang en toetsbaarheid): (...) Het is helder welke handelingen en interventies individuele dieren zullen ondergaan echter het is voor de DEC leden niet goed mogelijk om in te schatten welk ongerief de vissenlarven van de interventies zullen gaan ondervinden. Er is een kennislacune met betrekking tot de daadwerkelijke gevolgen voor de (fysiologie) van ZF larven als er XPD tumorcellen worden ingebracht die uitgroeien tot tumor achtige structuren. Vooralsnog kunnen de meeste DEC leden (6 van de 7), vooral gezien de lange ervaring van de aanvragers met ZF onderzoek, wel 'leven met' de ongeriefclassificatie zoals gegeven door de aanvrager. Het is voor de DEC leden wel duidelijk dat het gebruik van ZF larven veel voordelen biedt voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen.(...)De meerderheid van de DEC is ervan overtuigd dat op zorgvuldige wijze, met behulp van heldere go/no-go momenten, de voortgang van het project beoordeeld wordt waardoor er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Eén lid is van mening dat er geen heldere go/no-go momenten zijn; zie het minderheidsstandpunt.(...)</p> <p>C9 (bijzondere categorieën): (...) De vissen zullen worden gedood volgens de richtlijn 2010/63/EU of dmv een snelle afkoelmethode. Dit is</p>
-------------------	--

naar inziens van de DEC voldoende onderbouwd.

Ethische afweging van de DEC:

1. Rechtvaardigt het onderzoek in zebravislarven naar pathobiologische aspecten van tumor ontwikkeling en – metastasering en naar therapeutische aangrijpingspunten met als uiteindelijk doel het opsporen van moleculaire of genetisch targets om deze tumorprocessen te kunnen blokkeren de inzet en het doden van 142.280 zebravislarven en het cumulatief licht tot matig ongerief dat de dieren wordt aangedaan?

2. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling: het bestuderen van de pathobiologie(tumor initiatie, - differentiatie, - infiltratie en – metastasering) van humane tumorcellen in zebravis larven. De doelstelling is om in dit zebravis model waarin humane tumorcellen worden ingespoten (xenograft) nieuwe medicamenten te testen op hun werkzaamheid.

Waarden die voor proefdieren, de zebravis larven, in het geding zijn: het proefdieronderzoek is nadelig voor de larven als gevolg van het, te verwachten, licht tot matige ongerief, het gedood worden en de aantasting van de fysieke integriteit van het dier.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel door het vergaren van nieuwe inzichten en onderzoeksresultaten, die waarschijnlijk gepubliceerd kunnen worden.

Waarden die voor de kanker patiënten bevorderd worden: een mogelijk groot voordeel omdat de informatie die verkregen wordt in de toekomst van waarde kan zijn voor de ontwikkeling van therapeutische strategieën die de progressie van kanker en de daaraan gerelateerde metastasering van tumorcellen kunnen verminderen.

De meerderheid van de DEC is van mening dat de belangen van de samenleving en die van huidige of toekomstige kanker patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.

Het is evident dat er behoefte is aan nieuwe effectieve kankerbehandelingen die tumor - en patiënt specifiek zijn. Dit voorgestelde onderzoek kan daaraan gaan bijdragen. De DEC acht de voorgestelde onderzoeken in zebravis larven van essentieel belang om inzicht te krijgen in de moleculaire mechanismen van tumorontwikkeling en om nieuwe therapeutisch targets te kunnen identificeren. Hiertoe zullen zebravis larven worden gebruikt. De DEC is van mening dat dit onderzoek niet proefdiervrij kan worden uitgevoerd en vind dat de inzet van 142.280 zebravis larven en het ongerief dat de dieren zullen ondergaan voor dit onderzoek gerechtvaardigd is.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De meerderheid van de DEC is van mening dat de waarden die voor de uiteindelijke doelgroep, de patiënten met kanker, bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft om met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De meerderheid van de DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kan worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren ethisch gerechtvaardigd.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat minderheidsstandpunt: Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Een van de DEC leden geeft een negatief advies. "De hoofdreden om tegen dit onderzoek te zijn is de enorme hoeveelheid dieren die men aanvraagt, terwijl tegenover die hoeveelheid dieren géén hele lage hoeveel ongerief per dier staat. Hieronder geef ik mijn argumentatie in meer detail.

Dat er zoveel dieren aangevraagd worden, heeft er niet alleen mee te maken dat zebravissen een grotere genetische diversiteit vertonen dan bijvoorbeeld muizen die als proefdieren worden gebruikt. De hoeveelheid aangevraagde proefdieren is ook zo hoog omdat het onderzoek heel breed is opgezet. Zoals in de laatste alinea van het project proposal staat samengevat, is men van plan maar liefst vier typen kankercellen, 20 inhibitors, 40 siRNAs en 10 antilichamen te testen. De zebravis wordt door de onderzoekers als 'high-throughput' model gepresenteerd om al deze (waarden van) variabelen te kunnen testen, en dit is blijkens het antwoord op onze vraag 2 de hoofdreden om voor zebravissenonderzoek te kiezen. Het doen van veel dierproeven op veel dieren is daarmee inherent aan de onderzoeksstrategie, en dat staat op gespannen voet met de ambitie om minder proefdieren te gebruiken.

Een hoofdargument dat de onderzoekers geven om zoveel dierproeven te

willen doen is dat ze 'personalized medicine' willen bevorderen. Door zoveel (waarden van) variabelen te onderzoeken, is klaarblijkelijk het idee, kan voor een individuele patiënt worden gekeken op welke onderzoekssituatie zijn of haar toestand het meest lijkt en kan zo de therapie worden bepaald. Zo ingevuld stimuleert het ideaal van 'personalized medicine' het gebruik van veel proefdieren en staat het haaks op de genoemde ambitie om het aantal dierproeven te verminderen (die mijns inziens samenhangt met de erkenning van de intrinsieke waarde van proefdieren).

Het is hier overigens ook van belang dat de go/no-go momenten, zoals ze nu geformuleerd zijn, geen mogelijkheid bieden om het aantal proefdieren te verminderen. Ze dienen niet om te bepalen hoeveel waarden er van bepaalde variabelen worden getoetst, maar alleen welke; het aantal waarden dat getest gaat worden ligt vast. Bij de eerste zogenoemde go/no-go beslissing (zie appendix pagina 3) staat bijvoorbeeld al vast dat er 6 cellijnen en 40 LNPs-shRNAs getest zullen worden en wordt alleen een keuze voor specifieke cellijnen en LNPs-shRNAs gemaakt.

Nergens in het onderzoeksvoorstel of één van de andere documenten wordt beargumenteerd of aannemelijk gemaakt dat zebravislarven bijzonder weinig ongerief van het onderzoek zouden ondervinden. Het aantal dieren dat 'mild' ongerief zal ondervinden wordt op 127.420 ingeschat en het aantal dat 'matig' ongerief zal vinden op 14.860; er is geen sprake van dat 'mild' en 'matig' ongerief voor een zebravislarve iets heel anders zou inhouden dan voor muizen. Gezien de enorme aantallen dieren mag niet te lichtvaardig worden aangenomen dat het met het pijn of lijden van zebravissen wel mee zal vallen, als we dat niet goed weten. Daarnaast is twijfelachtig of het gebruiken en doden van proefdieren op zich ethisch neutraal is, zelfs als alles pijnloos gebeurt. Ook vanuit dat oogpunt is het grote aantal dieren dat is aangevraagd problematisch.

Ik kan me moeilijk voorstellen dat een onderzoek met soortgelijke aantallen muizen positief ontvangen zou worden, en het mag niet zo zijn dat de belangen van zebravissen dan wel zebravislarven minder meegeteld worden dan die van muizen zolang daar geen goede inhoudelijke redenen voor gegeven worden. Die redenen heb ik noch in de aanvraag noch in de bespreking van de DEC voorbij horen komen. Er was bij de DEC wel sprake van een gevoel dat zebravissen er toch minder toe deden (al dan niet omdat hun vermogen tot lijden volgens de persoonlijke inschatting van de spreker beperkt zou zijn), maar de onderbouwing daarvan was zeer beperkt. Naar mijn idee wordt er dus zonder goede gronden een onderscheid gemaakt op basis van soort en dat vind ik ethisch problematisch.

Hoewel ik het onderzoek zeker een substantieel belang toeken – het betreft ernstige aandoeningen die veel voorkomen en ik geloof best dat

	<p>het nieuwe inzichten en betere behandelmethoden kan opleveren – geef ik om de bovengenoemde redenen een negatief advies. De aanvragers hadden mijn inziens genoeglijk moeten aantonen dat zebravislarven een zeer beperkt vermogen om te lijden hebben, óf het onderzoek veel minder breed en met inbegrip van goede go/no-go criteria moeten opzetten, zodat er niet zo ontzettend veel dieren nodig zouden zijn.”</p> <p>De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC: Citaat: Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen duidelijke dilemma's naar voren gekomen. Wel is het voor de DEC leden niet goed mogelijk om in te schatten welk ongerief de vissenlarven van de interventies zullen gaan ondervinden.</p>
--	--

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en volledig. Er is inzicht gegeven in de vragen die zijn gesteld. Bij de onderbouwing van de C vragen gebruikt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op een logische manier uit de antwoorden op de C vragen.</p> <p>Het minderheidsstandpunt is helder weergegeven en goed uiteengezet.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	<p>5.1 lid2e</p> 
--------------------------------	---

3V's

<p>Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.</p>	
---	--

Hergebruik	<p>Er is geen sprake van hergebruik van dieren.</p>
-------------------	---

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts	Ja	niet volgens de richtlijn. Citaat: The zebrafish will be killed using an overdose of the anesthetic Tricaine (this method is described in Annex IV of Directive 2010/63/EU) or by cooling as recently described (Biology 2022, 11(4), 546; https://doi.org/10.3390/biology11040546). The rapid cooling method faster time to death and fewer signs of distress in euthanized zebrafish, we advocate this method as a humane veterinary practice.

Naam proef		
3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts		
Zebravissen (Danio rerio)	Ongerief: 10,4% Matig 89,6% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

De aanvraag is een voortzetting van **5.1 lid2h**. De aanvrager is gevraagd om wat meer toelichting te geven over in dit voorgaande project behaalde resultaten.

Zebravissen en larven worden gedood door overdosis anestheticum of door koeling. Deze laatste methode staat niet in de richtlijn beschreven maar is wel een gangbare methode voor de doding van zebravissen. De instelling heeft een ontheffing van de NVWA om deze methode te gebruiken. De DEC en **5.2 lid1**

Eén van de DEC leden heeft een minderheidsstandpunt ingenomen (zie DEC advies). Deze persoon heeft voornamelijk moeite met de brede opzet, het groot aantal dieren dat wordt aangevraagd en het ongerief dat de dieren ondervinden. Daarbij wordt het als ethisch problematisch ervaren dat er onderscheid wordt gemaakt op basis van soort (een vis is kennelijk minder waard dan een muis).

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.1 lid2h

5.1 lid2h

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 28 december 2022 14:31
Aan: 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202216495

Geachte 5.1 lid2e

Op 19-10-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 02216495. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

- U gebruikt de term euthanasie. De CCD vindt dat het woord "doden" en beter beeld geeft van wat er met de dieren gebeurt. Kunt u de term vervangen?
- Er komt in de NTS vakjargon voor en ingewikkelde termen als "ex vivo", "in vitro" en "preklinische resultaten". Kunt u de tekst nog een keer doorlopen en moeilijke termen vervangen of uitleggen?
- Onder "verfijning" vermeldt u dat dieren "uit het experiment gehaald worden". Het lot van deze dieren zal voor een algemeen publiek wellicht niet duidelijk zijn. Kunt u benoemen dat deze dieren gedood worden?
- Kunt u de wijzigingen direct doorvoeren in het verplicht gestelde Excel format en deze bij ons indienen?

Onduidelijkheden

- In het projectvoorstel verwijst u naar eerder behaalde resultaten onder 5.1 lid2h. Kunt u iets toelichten over de in dit project behaalde resultaten en hoe deze zich verhouden tot de aanvraag die u nu heeft ingediend?
- In de bijlage dierproeven onder F geeft u het ongerief per handeling en per experimentele groep weer. Kunt u nog samenvatten welke percentages per ongeriefcategorie gelden voor de bijlage als geheel?
- In de bijlage geeft u onder "verfijning" weer dat er anesthesie wordt toegepast. Neemt u nog andere maatregelen om te zorgen dat de dierproeven zo verfijnd mogelijk verlopen?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Uw aanvraag zal 6 januari worden besproken in de CCD vergadering. Antwoorden die voor die datum worden ingediend zullen worden meegenomen in de bespreking van uw aanvraag.

Wanneer een beslissing

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

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Beste **5.1 lid2h** ,

Hierbij mijn antwoorden op de CCD vragen over het project "Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model" met aanvraagnummer AVD**5.1 lid2h** 202216495.

Niet technische samenvatting

- U gebruikt de term euthanasie. De CCD vindt dat het woord "doden" en beter beeld geeft van wat er met de dieren gebeurt. Kunt u de term vervangen?

Aangepast in nieuwe, bijgevoegde NTS

- Er komt in de NTS vakjargon voor en ingewikkelde termen als "ex vivo", "in vitro" en "preklinische resultaten". Kunt u de tekst nog een keer doorlopen en moeilijke termen vervangen of uitleggen?

Aangepast in nieuwe NTS

- Onder "verfijning" vermeldt u dat dieren "uit het experiment gehaald worden". Het lot van deze dieren zal voor een algemeen publiek wellicht niet duidelijk zijn. Kunt u benoemen dat deze dieren gedood worden?

Aangepast in nieuwe NTS

- Kunt u de wijzigingen direct doorvoeren in het verplicht gestelde Excel format en deze bij ons indienen?

Aangepast in nieuwe NTS

Onduidelijkheden

- In het projectvoorstel verwijst u naar eerder behaalde resultaten onder **5.1 lid2h . Kunt u iets toelichten over de in dit project behaalde resultaten en hoe deze zich verhouden tot de aanvraag die u nu heeft ingediend?**

5.1 lid2h

De zebra vis modellen zijn initieel geoptimaliseerd door injectie van bestaande kanker cellijnen in larven van twee dagen oud. Vervolgens zijn kanker fenotypen met en zonder chemische en genetische behandeling gemonitord tot 4 of 6 dagen na behandeling. Meerdere vooraanstaande publicaties en deelname in vele internationale **5.1 lid2h**

en nationale **5.1 lid2h**) medische beurzen laten zien dat de zebra vis een excellent model is om celmigratie, celdeling, angiogenese, micro-uitzaaiing en reactie op het immuunsysteem in levende vissen in beeld te brengen tijdens tumor ontwikkeling (9-11, 14-33).

Ervaring en succes van deze aanpak heeft ons in staat gesteld om vervolgens cellen geïsoleerd uit patiënt tumoren te injecteren in zebra vissen. Daarmee hebben wij modellen ontwikkeld voor 'patient-derived xenotransplantation' in zebra vissen (ZF-PDX) voor borstkanker en oogmelanoom om de effectiviteit van nieuwe behandelingen op de tumoren te testen (26, 31, 32, 34 en ongepubliceerd). **5.1 lid2h**

5.1 lid1c

5.1 lid1c

In conclusie, 5.1 lid2h hebben we aangetoond dat het zebravis xenograft model gebruikt kan worden om het mechanisme van uitzaaiing en interactie met immuuncellen te bestuderen. Ook kunnen er nieuwe medicijnen mee getest worden. In het nieuwe project zetten we de succesvolle onderzoekslijnen door, echter zullen we hoofdzakelijk cellen uit primaire tumoren van patiënten injecteren om de persoonlijke respons van patiënten tegen de behandeling te evalueren. Door gebruik te maken van zebravis modellen kunnen we de complexe interacties tussen de tumor en het lichaam nabootsen, wat niet gedaan kan worden met huidige cel- of organoid modellen. Behandelingen die veelbelovend zijn in de larven tot 8 dagen oud zullen worden getest in jonge en volwassen vissen om eventuele medische toepasbaarheid te vergroten. De laatste validatie zal worden gedaan in muismodellen door collaborators zodat de behandelingen mogelijk gerekruteerd kunnen worden voor klinische trials.

Deze informatie is toegevoegd in het projectvoorstel.

- In de bijlage dierproeven onder F geeft u het ongerief per handeling en per experimentele groep weer. Kunt u nog samenvatten welke percentages per ongeriefcategorie gelden voor de bijlage als geheel?

Van alle 142.280 vissen ondervindt 10.4% moderate ongerief en 89.6% mild ongerief. Is aangepast in appendix.

- In de bijlage geeft u onder "verfijning" weer dat er anesthesie wordt toegepast. Neemt u nog andere maatregelen om te zorgen dat de dierproeven zo verfijnd mogelijk verlopen?

Voor zeer agressieve cellijnen wordt de hoeveelheid geïnjecteerde cellen bepaald aan de hand van de minimale hoeveelheid die nodig is om kankereigenschappen waar te nemen. De dieren worden om de dag bestudeerd op tekenen van ongerief en per direct gedood zodra lijden wordt vastgesteld.

Is aangepast in appendix.

Met vriendelijke groet

5.1 lid2e



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 the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model

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
- 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 2.1.

Despite continuous effort cancer mortality remains 8.2 million per year worldwide. This number accounts for almost 15% of worldwide deaths (1). Although mortality rates are decreasing, cancer incidences are expected to raise in the next two decades what underlines the necessity for more effective anti-cancer

strategies. There is a clear need to develop more sophisticated bioassays and models that go beyond the *in vitro* use of classical cancer cell lines and *in vivo* mouse xeno-transplantation studies, and allow medium to high-throughput target discovery and drug lead identification. To this aim analyses within a complete organism are needed to grasp the full complexity of the interaction between treatment, cancer and host.

Zebrafish (*Danio rerio*) are increasingly used as a model organism to study cancer (2). Benefits include large clutch size, *ex utero* development and easy manipulability of larvae (3). There is high conservation of oncogenes and tumor-suppressor genes between zebrafish and human therefore data collected in zebrafish are relevant for humans (4). The histology of zebrafish tumors has been shown to be highly similar to tumors found in human cancers (5). The immune system of the zebrafish resembles that of higher vertebrates in many aspects. Zebrafish possess the full set of immune cells which mediate the innate and acquired immune response in mammals. Many of the genes and critical pathways that are required to grow these features are highly conserved between humans and zebrafish. The zebrafish embryo offers an unparalleled opportunity to study innate immune responses without the influence of an acquired response, which starts to operate much later in development. The adaptive immune system in zebrafish does not reach maturity until 4 weeks post-fertilization (6), allowing circumvention of cell graft-host rejection by using zebrafish in early stages. The interconnection between the innate and adaptive immunity can be addressed in the adult animals therefore the final validation of results obtained in the larval stages will be conducted in adult animals.

Zebrafish (ZF) larvae can absorb various small molecular weight compounds from water, which is advantageous when screening for anti-cancer compounds (7). In addition, drugs can be administered in dissolved or nanocarrier-encapsulated form by injection into the blood (IV) or behind the eye (8-10). Recently we have shown that ZF cancer models are suitable to test delivery modalities and efficacy of light activated drugs (10-11). Zebrafish experiments require much less material than in the mouse model to assess drug efficacy. Routinely we inject 200-500 cancer cells per larvae and use 1 ml of drug solution for 6 individuals once administered from egg water by immersion. Alternatively we inject 1-2nl of dissolved or nanoparticles-containing drugs (9-11). The experimental costs are low and procedures are simple and fast. The use of zebrafish in drug discovery in a time- and cost- effective manner initiated many clinical trials during the last two decades (7). For melanoma, a presently on-going phase II/III clinical trial of leflunomide combined with vemurafenib is the first to arise from initial screens in zebrafish.

Harnessing of transgenic lines with fluorescent vasculature, neutrophil granulocytes or macrophages, allows live, non-invasive imaging of proliferation, migration and tumor-associated neo-angiogenesis and interaction with microenvironment at the single cell resolution in the contacts of the entire organism within 1 week (12-13).

5.1 lid2h



medical grants demonstrated

that the zebrafish is an excellent model system for this purpose as xenotransplantation with human carcinoma cells is possible and cancer cell migration, proliferation, angiogenesis, micro-metastasis and immune response can be monitored *in vivo* within the developing tumor (9-11, 14-33, selected publications).

5.1 lid2h



5.1 lid2h

[REDACTED]

[REDACTED] **(ZF-PDX) models** for different cancers 5.1 lid2h
[REDACTED] to assess therapy response to new treatment strategies (26, 31, 32, 34 and unpublished). 5.1 lid1c [REDACTED]

[REDACTED] All previously published results provided robust evidence that pharmacokinetics per se is not a cross-species barrier for ZF-PDXs (3, 31, 34, 35). First clinical trials using ZF-PDX system are initiated in the USA and many are in pipeline in Europe. Importantly, olaparib plus temozolamide treatment tested in zebrafish adult PDX and xenograft models of rhabdosarcoma, without additional model prerequisites, is in phase I of clinical trial (3, 7, 35). 5.1 lid1c [REDACTED]

[REDACTED]

5.1 lid2h

[REDACTED] perform a high-throughput screen of drugs on primary biopsy materials as well patient derived organoids (31, 32 and Figure 2).

To conclude, in past years we successfully established ZF-xenograft models to study cancer pathogenesis, metastases mechanisms and treatment. Importantly we have proven translational value of this model for clinical applications. 5.1 lid2h [REDACTED]

[REDACTED]

In this new project we will engraft into zebrafish immortalized cancer cell lines as well primary cells derived from patient cancers to screen for drug targets and test the personalized drug response under conditions that may mimic *in vivo* environment including the complex interactions between tumor and immune cells of the host. This complexity can not be achieved in the current cell-based or organoid cancer models. Most experiments in this project will be performed in the zebrafish larvae. The promising treatments obtained in the larval stage will be tested in older animals with developed organs to prove that results gained in the larval stages are relevant for adult animals. This is necessary for translation of the results obtained in zebrafish to eventual medical applications. Candidate gene targets and drugs, selected based on their efficacy in the versatile zebrafish cancer models will be further validated in the mouse pre-clinical models and prioritized for clinical trials by our collaborators.

We plan to use primary cells derived from prostate, glioblastoma, breast and eye patient tumors or cells derived from PDX tissues initially propagated in mice models and test 20 inhibitors, 40 siRNAs and 10 antibodies prioritized based on the available knowledge from literature as well as our anti-cancer measurements in cells and zebrafish xenograft models until 5 days post fertilization (dpf).

Although the zebrafish xenograft model has many advantages it still involves the use of animals and we will elaborate in this 5 year project proposal on the 3 R's strategy to reach our goals.

1. Globocan 2012 http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
2. Liu S, Leach SD. Zebrafish models for cancer. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 71-93.
3. Fazio M, et al. Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20: 263-273; doi: 10.1038/s41568-020-0252-3.
4. Howe K, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013; 496: 498-503;doi: 10.1038/nature12111
5. Amatruda JF, Shepard JL, Stern HM, et al. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer cell* 2002; 1: 229-231.
6. Lam SH, Chua HL, Gong Z, et al. Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev Comp Immunol* 2004; 28: 9-28.
7. Patton EE, Zon LI, Langenau DM. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nature reviews. Drug discovery*. 2021; 20:611-628; DOI:10.1038/S41573-021-00210-8.
8. Sieber S, et al. Zebrafish as a preclinical in vivo screening model for nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2019: doi.org/10.1016/i.addr.2019.01.001.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

12. Lawson ND, Weinstein BM. In vivo imaging of larval vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 2002; 248: 307-318.
13. Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DM, et al. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood* 2006; 108: 3976-3978.

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

5.1 lid2h, 5.1 lid2e

35. Yan C et al., Visualizing Engrafted Human Cancer and Therapy Responses in Immunodeficient Zebrafish 2019, Cell 177, 1903–1914; doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.004

36. Pattipeiluhu R, et al. Anionic Lipid Nanoparticles Preferentially Deliver mRNA to the Hepatic Reticuloendothelial System. Advanced Materials 2022; DOI: 10.1002/adma.202201095

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

Ultimate aim of this project is: **discovery of genetic cancer targets and assessment of drugs for incurable solid cancers using zebrafish xenograft model.**

Immediate goals of this project will concentrate on the fundamental mechanisms controlling invasive cell migration, proliferation, tumor angiogenesis, metastatic initiation and interaction with host microenvironment **to predict targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies.** This will be achieved by: i) chemical inhibition of tumor phenotypes in engrafted larvae, ii) gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by LNP-Si-RNAs intravenous injection to block cancer or host genes responsible for cancer progression; iii) through inhibition of cancer phenotypes with selected antibodies, iv) transcriptomic, proteomics and metabolomics (Omics) analysis of cancer cells in culture versus cells forming experimental metastasis in the engrafted larvae. For this approach we will use immortalized cancer cells from zebrafish, mice and human origin as well patient-derived material directly from patients or after a propagation step in the organoids culture, or in mouse patient derived xenografts (PDX). The cancer phenotypes (cell migration, angiogenesis, proliferation, metastatic onset, interaction with host microenvironment) induced by engraftment of fluorescent cancer cells will be microscopely examined and the relative tumor burden will be calculated by measuring the integrated fluorescent density in the fish at different days post injection (dpi) and normalized with respect to the burden at 1dpi.

The ZF-PDX strategy is also a powerful tool to predict aggressiveness of the primary human cancer cells and will be used for staging and assessment of prognostic value of the tumor cells derived from patients. This animal bio-imaging assay will serve as a first-line *in vivo* screening step in the anti-cancer drug discovery pipeline and optimization of drug administration modalities reaching the maximal efficacy without side-effects. In addition, the transcriptomic, proteomics and metabolomics analysis of cancer cells as well surrounding host stroma cells (e.g. macrophages) forming experimental metastasis in the engrafted larvae will lead to the identification of novel therapeutic targets for anti-cancer treatment. Selected targets will be initially validated by gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by LNPs-Si-RNA injection to block cancer or host genes responsible for cancer progression. The stringently selected, promising candidates will be further validated by engraftment of human cancer cells into the adult immunocompromised zebrafish to eliminate possible developmental artefacts induced by engraftment of human cancer cells into the zebrafish larvae (Group IV, see appendix). Final validation will be performed by our collaborators in the mouse pre-clinical models.

We believe that our immediate goals to achieve the ultimate goal are achievable because we have already established many models for incurable cancer types which will be used for basic and therapy-focus research in this project.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

All expertise, technology, chemical libraries and biological material, obtained from commercial sources or our medical collaborators justified by the material transfer agreements between different institutions are in place to conduct this project.

We have a strong clinical network of national (5.1 lid1c) and international (5.1 lid1c) collaborators with whom we will work together to utilize the full potential of zebrafish cancer models for translational research.

Many molecular and cellular components involved in tumorigenicity are highly conserved between zebrafish and human making this platform clinically relevant for translational, pre-clinical research towards personalized medicine. Successful integration of the zebrafish platform into preclinical anticancer drug target discovery and lead compound selection will reduce usage of rodents, time and costs.

5.1 lid2h

. For example, to study the dynamic and reciprocal interactions between tumor cells and their host microenvironment we established a xenograft model by injecting fluorescent red 5.1 lid2h into the green fluorescent blood

circulation of transparent zebrafish larvae. This resulted in rapid formation of an experimental micro-metastasis, allowing time-resolved imaging of this process at single-cell level within one week (Figure 1).

5.1 lid2f

5.1 lid2f

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

Cancer continues to pose a major therapeutic challenge, as for some solid cancers, the prospects of cure remains remote, whilst their incidence stays high. A predominant challenge in developing curative cancer treatment is the co-evolution of tumor with its microenvironment. This project will provide more **scientific** insight into the mechanism of cancer development and its host microenvironment interactions to predict targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies.

Novel molecular signatures representing cancer aggressive drivers will be identified and attenuated by chemical or genetic intervention. In addition, development of the patient derived xenotransplantation models in zebrafish will allow testing of the personalized drug response in a time- and cost- effective manner with unprecedented **social** relevance.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

The research activities performed within the project will lead to new scientific knowledge and insights on the mechanisms of tumor development and *in vivo* efficacy of the new anti-cancer treatments. [5.1 lid2h](#) involved researches and students will benefit from knowledge generated in the immediate goals of this project. This innovative research with scientific and medical relevance will embark them with the experimental and theoretical knowledge to boost their future careers and job chances. Proposed project will lead to discovery of genetic cancer targets and assessment of drugs efficacy using patient material therefore in long terms patient will be the most important stakeholders. Success of this project should also attract interest of biotech companies to promote the utilization of obtained knowledge, model applications and therapy implementation towards the clinic. Importantly, the zebrafish are stakeholders because they are bred, used in procedures and killed under strict conditions using state-of-the-art facilities for this project. Their interest is that the that discomfort and the animal numbers are reduced to a minimum.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

Our overall strategy is to use the zebrafish xenograft model to study the fundamental mechanisms controlling cancer cell migration, heterogeneity, biology of metastatic initiation and interaction with host microenvironment to predict targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies with potential clinical application. For this purpose, we will use the overall design of the project illustrated in the schematic overview of overall approach (Figure 2) which composes of five different steps:

- 1) **engraftment** of the immortalized cells isolated from mice, zebrafish, human cancers and primary cancer cells directly derived from patients or after PDX propagation in mice or in organoids culture into zebrafish wild type, fluorescent reporter or mutant larvae or juvenile fish;
- 2) **treatment/intervention:** a) chemical inhibition of tumor growth in engrafted larvae will be performed by absorption of various small molecular weight compounds from growth medium or by IV injection of dissolved or nanoparticles-encapsulated drugs; b) genetic inhibition will be conducted by gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by LNP-Si-RNAs IV injection to block cancer or host genes responsible for cancer progression; c) through immunotherapy with selected antibodies;
- 3) **data acquisition** by direct fluorescent imaging of tumor progression and histological examination with cancer markers and identification of novel molecular signatures by the transcriptomic, proteomics and metabolomics (Omics) analysis of cancer cells in culture versus cells forming experimental metastasis in the engrafted larvae;
- 4) promising **candidate gene targets and drugs** will be selected based on their efficacy on metastatic dissemination, angiogenesis and metastatic onset in zebrafish larvae until 8 dpf (Group I);
- 5) **validation of prioritized candidate gene targets and drugs** by engraftment of selected human cancer cells into older larvae and sporadically into immunocompromised juvenile zebrafish for examination of their anti-tumor effects (as described in step 2) on more progressed tumors (metastatic) in the contacts of fully developed organs in older larvae and juvenile (Group II and III).

In the first step: **engraftment**, fluorescently labeled cancer cells derived from mice, zebrafish and human cancers will be injected into the perivitelline space, blood circulation, behind the eye or brain cavity of 2 days old anaesthetized zebrafish larvae (wild-type, larvae with mutation in cancer related pathways, or larvae with fluorescent markers for different tissues) to microscopically monitor cancer cell migration, proliferation, angiogenesis and interaction with host stroma cells. To this aim cancer cells for example in

red will be engrafted into larvae with green vessels and blue immune cells and metastatic behavior will be assessed by a non-invasive bio-imaging platform already developed in our group. In this pilot study (Group I: 5-8 dpf) optimal injection site and cell lines, which survive in the larvae will be prioritized for further investigation (GO/NO GO decision). In order to monitor and eventually inhibit the crucial cancer phenotypes as metastatic dissemination, proliferation, angiogenesis, interaction with host microenvironment (vessels, stroma and immune cells of zebrafish) and metastatic initiation we will extend duration of the experiment until 6 or 8 days post fertilization (dpf) without feeding of the larvae (Group I). For promising candidate gene targets and drugs, selected based on their efficacy on metastatic dissemination, angiogenesis and metastatic onset in zebrafish larvae until 8 dpf (Group I) after GO/NO GO decision experiments will be followed for additional 7 days to prove their effect on more progressed, metastatic tumors (Group II: 9-15 dpf) and finally validated in juvenile with developed organs to prove that results obtained in the larval stages are relevant for adult animals (Group III: up to 63 dpf).

After establishment of the engraftment conditions (injection site, cell line, drug concentration) up to day 5, the engrafted larvae will be subjected to different **treatments**. To inhibit metastatic onset engrafted and control larvae will be divided in 24 well plates (6 larvae per well) and exposed to selected concentration of drugs by adding them into the medium one day post implantation and refreshed every second day. Dissolved drugs or encapsulated in nanoparticles will be tested by retro-orbital or IV injection of 1-2 nL into 4 dpf anaesthetized larvae. Genetic inhibition of metastasis will be conducted by gene interference in cancer cells prior engraftment into zebrafish or by IV injection of 1-2 nL of LNP-Si-RNAs into 4 dpf anaesthetized larvae to block cancer or host genes responsible for cancer progression. For immunotherapeutic tests antibodies will be injected into the circulation one day post engraftment of cancer cells. To inhibit already formed tumors the antibodies and drugs will be directly injected into the tumor or circulation approximately at 9-15 dpf. The control group will be injected with the solvent at the same time point. The microscopic **data acquisition** will be conducted in anaesthetized larvae. The **candidate gene targets and drugs** will be prioritized based on the therapeutic efficacy quantified by microscopy, histology and transcriptomics approaches. Selected drugs will be further refined and therapeutic efficacy will be validated. For **validation** selected control cancer cells and cells with the candidate genes genetically modified by RNA interference will be injected into 2 dpf larvae (wild-type, larvae with mutation in cancer related pathways, or larvae with fluorescent markers for different tissues) and exposed to prioritized drugs as previously described. **Discovery of new gene targets and drugs** will be evaluated in near-patient *in vivo* mice models by our collaborators outside of this project.

The different steps of the project form an integrated platform for preclinical anticancer drug target discovery and lead compound selection. The different steps of the projects form a coherent procedure required to achieve our milestones:

1. Number and characterization of ZF-xenotransplantation models established.
2. Re-isolation of cancer cells from metastasis for transcriptomics, proteomics, metabolomics optimized
3. Inhibition of metastatic onset through chemical inhibition achieved: candidate drugs discovered
4. Inhibition of metastatic onset through genetic interference achieved: candidate gene targets discovered
5. Inhibition of metastatic onset through immunotherapy achieved: candidate antibodies selected

For this project

1. We aim to select 16 cell lines inducing reproducible cancer phenotypes in larvae until 8 dpf.
2. We aim to test 20 inhibitors, 40 siRNAs and 10 antibodies in larvae until 8 dpf and select promising candidates for validation in older larvae (Group II: 9-15 dpf).
3. We estimate to test 4 cell lines, 6 inhibitors, 6 siRNAs encapsulated in lipid nano particles (LNP) and 2 antibodies prioritized for anti-metastatic treatment in older larvae with more advanced tumors (Group II: 9-15 dpf).
4. We estimate to test 4 cell lines, 3 inhibitors and 4 LNP-siRNAs for validation of anti-metastatic efficacy in a juvenile (non-larvae) model with fully developed organs (Group III: up to 63 dpf).

See also figure 2 (below) for a more overall schematic design of the project.

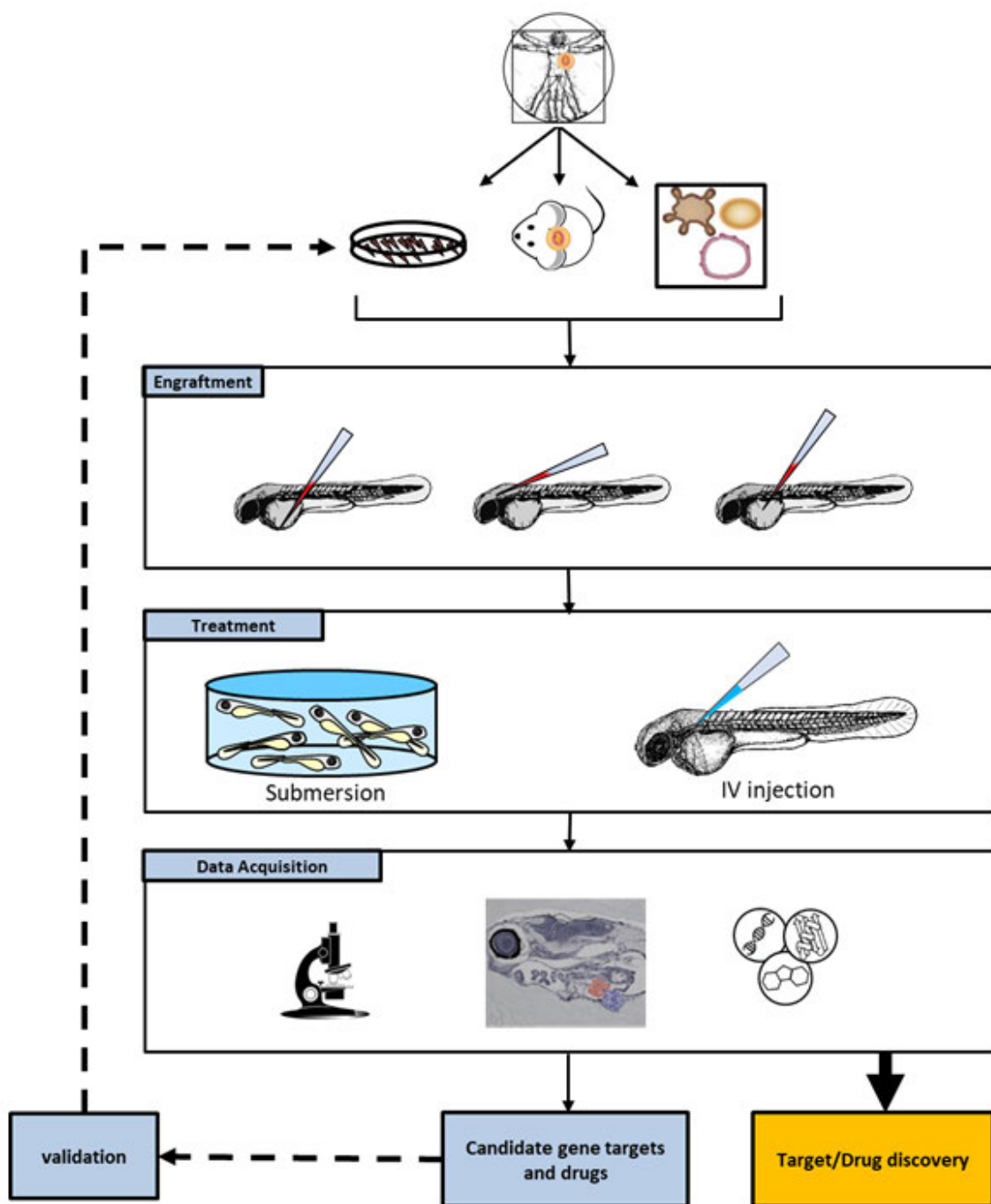


Figure 2. Translational cancer research in the zebrafish pipeline. Cancer cells from different origin (cell line, patient derived xenograft or organoid) are fluorescently labeled and injected into the zebrafish larvae at different positions at 2 dpf. Engrafted larvae treatment includes the drug administration by submersion or by IV injection of dissolved or nanocarriers encapsulated drugs and LNP-Si-RNA or antibodies. Cancer phenotypes are monitored by fluorescent microscopy. In parallel samples are taken for histology and transcriptional analysis (or 'OMICS analysis). Candidates gene targets and drugs are selected and validated through different approaches in the zebrafish (shRNA against a drug target in the same cell line etc.) Prioritized targets will be subsequently selected for pre-clinical validation outside of this project.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Our project will only entail the experiments in zebrafish models and use minimal number of animals . All experiments will comply with internationally established principles of Replacement, Reduction and Refinement (**the international 3R principle**). To reduce number of animals and refine their discomfort we will integrate GO/NO GO decisions after each step of the project as indicated in the appendix. For example the selection of promising cell lines, optimization of engraftment procedure and initial toxicity test with drugs will be performed with larvae until 5 days post fertilization. We will select only promising xenograft models and drugs that can be tested without over toxicity. This pre-screen will allow selection of the optimal concentrations and delivery modality of drugs without toxic effects on the host and minimized usage of laboratory animals (larvae >5dpf) for more advanced drug screens. The duration of the animal experiment will be minimized in order to obtained pre-clinical relevant results. 5.1 lid2h

. After a license for this project will be obtained, all experiments for ongoing projects will formally be executed under this new license.

Success of integration of ZF xenograft models into drug and target discovery pipeline will reduce time and costs and accelerate pre-clinical discovery of new cancer treatments.

3.4.3 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	Drug and target discovery in zebrafish xenografts (submersion, IV injection, imaging, euthanasia)
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number	Type of animal procedure
1	Drug and target discovery in zebrafish xenografts

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Our experimental procedure is to inject fluorescent cells isolated from mice, zebrafish and human cancers into zebrafish wild type, fluorescent reporter or mutant larvae to generate new knowledge on basic cancer biology, which we will use for the development of compound and target discovery with potential clinical application. This procedure consists of multiple steps forming a coherent pipeline for drug and target discovery. The cancer phenotypes (cell migration, angiogenesis, proliferation, metastatic onset, interaction with host microenvironment) induced by engraftment of fluorescent cancer cells are microscopically examined. The relative tumor burden induced by wild type or genetically or chemically treated cells will be calculated by measuring of the integrated fluorescent density in the fish at different days post injection (dpi) and normalized with respect to the burden at 1dpi. Suitable genetic targets will be blocked with antibodies or can be modulated through immune reactions to inhibit or abrogate cancer growth or spread. In addition, IHC, transcriptomics and proteomics analysis of engrafted cells after genetic and chemical interference will identify a new genetic drug targets.

5.1 lid2h

This imaging based screening platform in zebrafish can rapidly determine the efficacy of either chemical inhibitors or genetic modification in cancer cells in an *in vivo* system and have potentially high translational value for patients (7).

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

Approximately 200-500 fluorescent cells of different incurable cancers (glioblastoma, osteosarcoma, cutaneous and eye melanoma, breast, prostate, bladder, colon, lung and pancreatic cancers) are injected at 2 days after fertilization of the eggs into the yolk sac, the duct of Cuvier, the perivitelline space, the brain cavity or behind the eye of the larvae using glass needle. During this manipulation the larvae are anaesthetized and show minimal signs of discomfort. The animals are observed daily and malformed larvae are removed and euthanized. The same procedure is used when engrafting cells into specific mutant zebrafish lines or reporter zebrafish lines related to cancer specific signaling pathways or organs, respectively. For treatments: either drugs are added to the water of the fish or intravenously injected into circulation in free or nanocarrier encapsulated form one day post engraftment of cancer cells (the level of expected discomfort is mild). The cancer cells are genetically modified prior to engraftment. The larvae stabilized/fixed in agar are imaged every 1st 4th and 6th day post injection (dpi) using a stereo fluorescent microscope. At the endpoint of the experiment the larvae are euthanized and used for either transcriptomics, IHC analysis or *ex vivo* propagation of tissue for subsequent re-enuftment (euthanasia, mild discomfort). When possible, the downstream analysis of the engrafted zebrafish will be combined (i.e. IHC or fluorescent cancer cell burden measurements and transcriptomics samples from the same group). For promising candidate gene targets and drugs, selected based on their efficacy on metastatic dissemination, angiogenesis and metastatic onset in zebrafish larvae until 8 days post fertilization (dpf) (Group I: 6-8dpf) after GO/NO GO decision experiments will be followed, including for additional 7 days to prove their effect on more progressed, metastatic tumors (Group II: 9-15 dpf) and finally validated in juvenile with developed organs to prove that results obtained in the larval stages are relevant for adult animals (Group III: up to 63 dpf) as requested for preclinical translation. From 8 dpf larvae and juvenile engrafted with cancer cells will be supplied with daily feedings.

For animal procedures we will subdivide the zebrafish in several age classes (**Group I: 5-8 dpf, Group II: 9-15 dpf and Group III: up to 63 dpf**).

The main body of the experimental procedures will be carried out on larvae of ages up to 5 days (no laboratory animals according to Directive 2010/63/EU for animals up to a maximum of 5 dpf). Based on the results obtained with the compounds or genetic interference strategies we will decide (GO/NO GO decisions) to validate anti-metastatic effects of treatments in the contacts of fully developed organs in older larvae and juvenile (Group II and III). The expected numbers of fish are outlined below.

Group I: 5-8 dpf

Inhibition of metastatic dissemination, angiogenesis, proliferation interaction with immune cells of the host and metastatic onset by:

Chemical inhibition:

Different cancer cell lines (16) will be engrafted into 2dpf larvae. At 1dpi engrafted larvae will be exposed in dissolved or nanocarrier-encapsulated form of 20 inhibitors/small molecules/drugs, which are prioritized based on their anti-proliferative efficacy on the same cancer cell lines *in vitro*. We will need two groups of larvae per experiment (inhibitor and vehicle control). The effects of treatment on the metastatic dissemination, proliferation, angiogenesis and interaction with immune cells of the host will be detected based on the analysis of multi-color, fluorescent images representing engrafted cancer cells, host vessels and immune cells at 0, 1, 3 days post treatment (dpt) of engrafted larvae. Automated image analysis have to be performed per group of larvae at 0, 1, 3 dpt. Due to the intrinsic biological variation (zebrafish are not inbred such as murine models) we have found based on the statistical analysis with the 25% reduction of cancer phenotype upon treatment, $p < 0.02$, 98% confidence interval and 80% power level that group sizes of 65 is required. In addition, this group will be enlarged by +/- 7% as this fraction of larvae dies or shows signs of discomfort during the experiment. In total 70 control and 70 treated larvae will be used in at least one or three biological repeats to obtain statistically significant reduction of cancer phenotypes upon treatment. In the course of this project we will verify a possibility to reduce number of larvae to yield significant differences between control and treated group.

- 20 inhibitors * 2 groups * 16 cell lines * 70 larvae = **44.800 larvae**

At 3 dpt (6dpf and 4dpi) the anti-cancer efficacy of 20 drugs will be evaluated and after **GO/NO GO** decision the experiments will be continued with selected promising cell lines and drugs until 5dpt (8dpf) to validate the effect of treatment on cancer cell extravasation from the circulation and metastatic onset.

shRNA interference:

Based on the anti-tumor efficacy of selected drugs the potential genetic pathways or targets will be predicted. Initial validation of the candidate genes will be performed *in vitro* based on their interference/knock down effects on cancer cell migration, proliferation and invasion. We plan to select 10 candidate genes for subsequent validation of their anti-tumor function in zebrafish model. To genetically disturb the gene of interest 3 shRNAs, which target different parts of the gene and 1 mock-scramble control constructs are required to justified specificity of the interference. The anti-cancer effect of disruption of 10 genes (40shRNA) in 12 cell lines will be detected by fluorescent imaging of control and cancer cells with genetically disrupt gene of interest at 1, 3 and 6 dpi in 70 engrafted larvae. Every experiment will be performed in at least one biological cohort. The effect of interference on metastatic dissemination, angiogenesis, proliferation and metastatic onset will be compared to scramble control, therefore only one experimental group per cell line is required.

- 40 shRNAs * 12 cell lines * 70 larvae = **33.600 larvae**

In addition, the interference of selected genes will be conducted by IV injection of 1 nL of shRNAs encapsulated into lipid nano particles (LNPs) at 1 and 3 dpi to block cancer or host genes responsible for cancer progression. We will select the 6 cell lines with the most robust phenotype in larvae based on **GO/NO GO** decision and test 40 LNPs-shRNAs on them. The anti-cancer efficacy of LNPs-shRNAs will be measured by fluorescent of engrafted cancer cells into larvae, which will be imaged individually at 0, 3, 5 dpt. To achieve statistical significant results every experiment will be performed in three cohorts with in total 70 larvae.

- 40 LNPs-shRNAs * 6 cell lines * 70 larvae = **16.800 larvae**

Immunotherapy:

When selected genetic targets are suitable to be blocked with antibodies (ABs) or can be modulated through immune reactions we will use antibody based immunotherapy to inhibit or abrogate cancer growth or spread in larvae until 8dpf. ABs will be injected into circulation of larvae in free or encapsulated form at 1dpi (2 conditions of treatment). The anti-cancer efficacy of ABs will be measured by fluorescent of engrafted cancer cells into 70 larvae, which will be imaged individually at 0, 3, 5 dpt.

We will select the 6 cell lines with the most robust phenotype in larvae based on **GO/NO GO** decision and test 10 antibodies on them. To achieve statistical significant results every experiment will be performed in three cohorts.

- 10 ABs * 2 groups * 6 cell lines * 2 treatments * 70 larvae = **16.800 larvae**

RNA isolation for transcriptomic analysis:

To identify genetic targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies we will apply the transcriptomic analysis of cancer cells in culture versus cells forming experimental metastasis in the engrafted larvae. For single cell RNA sequencing (scRNAseq) 10.000 cells per condition are needed for statistics, therefore the required cancer cells will be isolated from 100 engrafted larvae at 0 dpt and 5 dpt per condition. We want to test 3 conditions per cell line (untreated control and after shRNA/ chemical inhibition of target gene) comparing two time points. Three biological replicas are necessary for the statistical analysis of transcriptomics results. Using this methodology we will test 6 cell lines.

- 6 cell lines * 100 larvae per RNA isolation * 3 conditions * 2 time points * 3 cohorts = **10.800 larvae**

Total number of larvae in group I = 122.800 larvae

This point functions as a GO/NO GO step, only 4 cell lines inducing reproducible cancer phenotypes, 6 inhibitors, 12 shRNA-LNPs and 2 Abs selected in this group based on their potential to inhibit one of the cancer phenotypes induced by engrafted cells will be validated in older age groups.

Group II: 9-15 dpf

Inhibition of metastasis by:

Chemical inhibition:

On the basis of highly promising results in the larval model (**GO/NO GO decision**) we will follow up the effects of treatments in the later larval model (9dpf=7dpi=6dpt and 15 dpf=13dpi=12dpt). We will start with using 4 cell lines validated in earlier time points to micro-metastasize and induce blood vessel outgrowth. This prolonged experimental setup will be used as a validation step for chemical inhibitors found in group I at 6 and 12dpt. For each experimental condition 70 larvae for treatment and 70 control larvae are required.

- 6 inhibitors * 4 cell lines * 70 larvae * 2 time points = **3.360 larvae**

shRNA interference:

- 12 LNPs-shRNAs * 4 cell lines * 70 larvae = **3.360 larvae**

Inhibition of metastasis through immunotherapy:

We will test 2 antibodies on the 4 most promising cell lines (**GO/NO GO decision**) at two time points.

- 2 antibodies * 4 cell lines * 70 larvae * 2 time points = **1.120 larvae**

RNA isolation for transcriptomic analysis:

To identify genetic targets and pathways for novel cancer cell- and host-directed therapies we will apply the single cells transcriptomic analysis of cancer cells in culture versus cells forming experimental metastasis in the engrafted larvae. For scRNAseq 10.000 cancer cells per condition are needed for statistics, therefore the required cancer cells will be isolated from 100 engrafted larvae at 6dpt and 12dpt per condition. We want to test 3 conditions per cell line (untreated control and after shRNA/ chemical inhibition of target gene) comparing two time points. Three biological repeats are necessary for the statistical analysis of transcriptomics results. Using this methodology we will test 6 cell lines.

- 6 cell lines * 100 larvae per RNA isolation * 3 conditions * 2 time points * 3 cohorts = **10.800 larvae**

Total number of larvae in group II = 18.640 larvae

Group III (up to 63 dpf):

To validate our findings obtained in Group II in a juvenile (non-larval) model we will select 4 most promising cell lines, 1 target gene and 3 inhibitors (**GO/NO GO decision**). For this validation we will keep the number of animals to an absolute minimum. The anti-cancer efficacy of treatment in untreated vs treated fish (2 conditions) will be analyzed based on the alterations of metastatic spread, angiogenesis and proliferation; furthermore samples will be taken for histological analysis.

Histological analysis:

We never performed histological analysis on the 63dpf juveniles engrafted with cancer cells therefore a power calculation is not possible.

Based on our published histological and immunohistochemical analysis on the 35dpf juveniles engrafted with Ewing sarcoma cells (21) we estimate that at 63dpf 5 juvenile for control and 5 juveniles for treated group are sufficient for the histological analysis. In addition, this group will be enlarged by 2 extra individuals to correct for possible dropout during this experiment.

- 4 cell lines * 7 fish per group * 2 conditions = **56 juvenile**

shRNA interference:

To validate the anti-cancer efficacy obtained by the genetic inference of one possible gene target we have to provide results of two biological repeats (2 cohorts). For analysis we will compare untreated and treated juveniles (2 conditions).

- 4 LNPs-shRNAs * 4 cell lines * 7 fish per group * 2 conditions * 2 cohorts = **448 juvenile**

Chemical inhibition:

To validate the anti-cancer efficacy obtained by the chemical inhibition we have to provide results of two biological repeats (2 cohorts). For analysis we will compare untreated and treated juveniles (2 conditions).

- 3 inhibitors * 4 cell lines * 7 fish per group * 2 conditions * 2 cohorts = **336 juvenile**

Total number of fish in group III = 840 fish

Total number of animals required:

Group I = 122.800 larvae from 5-8 days

Group II = 18.640 larvae from 9-15 days

Group III = 840 juvenile up to 63 days

Total: 142.280

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

Based on the power analysis we have found that in general 70 larvae per experimental group (including 7% lost during experiment) are required for the robust generation of statistically significant and publishable results in larvae until 15dpf. The number of animals is estimated with LaMorte Power Calculation and t-test analysis.

Sample size = $(sd \text{ control group})^2 + (sd \text{ experimental group})^2 * Z / (\text{mean control group} - \text{mean experimental group})^2$

With input parameters based on the previous results:

- sd: 45
- Minimal detectable effect size: 25% decrease
- Control mean: 100 (total fluorescence per larvae divided by fluorescent area)
- Experimental mean: 75 (total fluorescence per larvae divided by fluorescent area)
- 98% confidence interval and 80% power level

we found that to obtain high statistical power of the results with $p < 0.02$ between control and treated group the group size of approximately 65 larvae until 15 dpf (Gr I and Gr II) is needed. In addition, this group will be enlarged by +/- 7% as this fraction of larvae dies or shows signs of discomfort during the experiment. The result of these experiments will be statistically tested through a Fischer's exact test, ANOVA or student t-test. In the course of this project we will verify a possibility to reduce number of larvae per group to yield significant differences between control and treated group. In addition, imaging of the same larva during the treatment will be applied if possible to minimize the number of animals.

- In general (based on the cancer type) only 5% of the larvae die due to mechanical damage during the engraftment procedure, subsequently only a minor fraction of the population (7%) dies during the experiment (largely dependent on the type of experiment and the aggressiveness of the cancer cells used).

Different *ex vivo* analysis techniques require different handling of the extracted tissue (e.g. cryo-sectioning or paraffin embedding). To reduce the number of animals that are required we will combine *ex vivo* assays for different parameters as much as possible.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Zebra fish (<i>Danio Rerio</i>)	Internal breeding	Larvae and juvenile	142.280	m/f	No	AB/TL

Provide justifications for these choices

- Zebrafish (*Danio rerio*) is quickly becoming a widely accepted cancer model, its optical transparency and high fecundity allow for high quality optical analysis of cancer progression up to single cell level in a semi-high throughput fashion.
- The zebrafish used are bred at our institution.
- Preliminary screens (both toxicity assays and optimizations of engraftment) will be performed in animals up to 5 days post fertilization, reducing the numbers of animals used for the final treatment strategies. All fish are monitored at least every other day for welfare status and euthanized immediately if any adverse effect occurs.

Species	<i>Danio Rerio</i>
Origin	Internal breeding at 5.1 lid2h
Life stages	Larvae and juvenile
Number	142.280
Gender	m/f
Genetic alterations	Yes, several lineage specific fluorescent reporter lines (e.g. vasculature, immune cells), mutant lines.
Strain	AB/TL

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

Animals are anaesthetised during the experiments. When symptoms of disease are observed humane endpoints will be applied.

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

In our experiments <7% of larvae die or show signs of discomfort 6-8 days post fertilization (dpf), therefore experiments will be initiated with 70 larvae to obtain results from at least 65 larvae for statistical analysis (70-7%~65). Animals showing signs of discomfort (physiological malformation or lack of response to lateral line stimulation) will be removed from the experiment. After 8dpf and 6 days post injection (dpi) increase

discomfort of animals may emerge. Animals showing locomotor abnormality (hypo or hyper activity, inactivity, twitching movements, swimming in circle), failure to feed or grow will be euthanized.

Explain why these effects may emerge.

The cancer engraftment introduces a relatively high number of cancer cells (which are required for the establishment of a robust cancer phenotype) into the zebrafish larvae, this can in some cases lead to an obstruction or perturbation of normal biological processes (perturbed liver function after liver invasion etc.). These adverse effects are intrinsic to cancer metastasis and cannot be avoided, although through thorough screening (in larvae up to 5dpf) and titration of the amount of cancer cells for engraftment we will keep the adverse effects to a minimum.

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

For very aggressive cells we will titrate the amount of cells, enabling us to prevent severe discomfort (within the timeframe of the experiment). The animals will be checked every other day and euthanized immediately if any adverse effect occurs.

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

The animals will be checked every other day for signs of general discomfort (as good as is possible in zebrafish larvae) and discomfort (e.g. aberrant physiology, lack of movement). Humane endpoints for group I are lack of response to lateral line stimulus and gross malformation for group II and III the same humane endpoint apply but are extended by cachexia (which is impossible to determine in larvae up to 8 days old). Humane endpoint is reached when the food uptake of the zebrafish is affected due to weakness and wasting of the body. When animals reach the humane endpoints they will be removed from the experiment.

Indicate the likely incidence.

Expected in <5%; maximally moderate discomfort no longer than 1 day.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

During the engraftment procedure the larvae are anesthetized. Within 30 minutes (after the anesthetic has worn off) the fish behave as normal, <5% of all larvae die during the engraftment. A schematic overview of the expected discomfort levels is provided in table 1. The level of discomfort is related to the progress of tumor growth. We expect that all animals that are injected with cancer cells experience mild discomfort (89.6% of total animal number). Although it is impossible to observe discomfort in the early stages of zebrafish development (2-3 weeks old). Expansion of tumor development can possibly induce malformation and abnormal swim behavior. This is considered to be moderate discomfort (10.4% of total animal number).

Table 1: Overview of expected discomfort in all zebrafish larvae experimental groups.

Description	Animal species/strain and sex	Number of animals	Discomfort (expected cumulative discomfort)	Discomfort is a sum of the following listed procedures:
-------------	-------------------------------	-------------------	---	---

Group I	5-8 days old zebrafish M/F	93%: 114.204	Mild	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (mild)
		7%: 8.596	Moderate	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (moderate)
Number (Group I)		122.800		
Number (Group II)		18.640		
Group III	9-15 days old zebrafish M/F	70%: 13.048	Mild	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (mild)
		30%: 5.592	Moderate	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (moderate)
Number (Group III)		840		
	Up to 63 days old zebrafish M/F	20%:168	Mild	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (mild)
		80%: 672	Moderate	Anaesthesia Imaging Euthanasia Tumor development (moderate)
Total number		142.280		

G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement	<p>Metastasis is a complex multistep process where cancer cells not only modulate their own intrinsic properties based on the surroundings, but also must overcome multiple challenges to be able to successfully form a metastatic outgrowth. Currently there are no <i>in vitro</i> replacements that can mimic the complex interactions that cancer cell undergo during metastasis, although many of the preliminary screens will be performed in zebrafish larvae of up to 5 days before validating previous experimental approaches in older animals.</p> <p>In addition, the candidate genes and drugs to be used in the zebrafish models will be initially selected <i>in vitro</i> based of their effects on cancer cell migration and proliferation.</p>
Reduction	<p><i>Ex vivo</i> assays will be combined as much as possible to reduce the number of animals that are required.</p> <p>To reduce number of animals and refine their discomfort we will integrate GO/NO GO decisions after each step of the project. For example the selection of promising cell</p>

	lines, optimization of engraftment procedure and initial toxicity test with drugs will be performed with larvae until 5-6 days post fertilization. We will select only promising xenograft models and drugs that can be tested without over toxicity. This pre-screen will allow selection of the optimal concentrations and delivery modality of drugs without toxic effects on the host and minimalized usage of laboratory animals for more advanced drug screens. The duration of the animal experiment will be minimalized in order to obtain pre-clinical relevant results.
Refinement	Amount of aggressive cancer cells for injection we will be minimized to obtain cancer phenotypes without severe discomfort (within the time frame of the experiment). Animals will be anaesthetized during engraftment to reduce the level of discomfort of the treatment. The animals will be checked every other day and euthanized immediately if any adverse effects occur.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

The proposed procedure is for fundamental and translational research, it does not consist of legally required research.

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Animals will be killed for *ex vivo* analysis.

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

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

The zebrafish will be killed using an overdose of the anesthetic Tricaine (this method is described in Annex IV of Directive 2010/63/EU) or by cooling as recently described (*Biology* **2022**, 11(4), 546; <https://doi.org/10.3390/biology11040546>). The rapid cooling method faster time to death and fewer signs of distress in euthanized zebrafish, we advocate this method as a humane veterinary practice.

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Naam van het project	De zebravis als model voor ontdekking van nieuwe behandelingen tegen kanker
NTS-identificatiecode	NTS-NL-743834 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	kankerbestrijding kankercellen veelvuldig testen van nieuwe medicijnen genetische modificatie kankercel-immuuncel interactie
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Oncologie Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Kanker bij de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>De zebravis wordt de laatste jaren steeds meer gebruikt als model voor kankeronderzoek. Doordat zebravistumoren veel overeenkomsten vertonen met de mens in hun DNA en cel-eigenschappen is de zebravis een geschikt modelorganisme voor een groot aantal menselijke soorten kanker. Zebravislarven zijn doorzichtig en ontwikkelen zich buiten de moeder wat ze zeer geschikt maakt voor onderzoek. Zo kan in zebravissen de ontwikkeling van uitzaaiingen en de reactie van cellen van het immuunsysteem op tumorcellen in beeld gebracht worden. De combinatie van beschikbaarheid van fluorescente zebravislijnen en gemakkelijke opname van chemicaliën uit het water, zorgt ervoor dat in dit model in een korte tijd fundamentele kennis vergaard kan worden.</p> <p>Wij hebben de afgelopen jaren zebravismodellen ontwikkeld om op grote schaal tumorgedrag te bestuderen en tumoren te beoordelen op gevoeligheid voor geneesmiddelen. Met behulp van deze modellen hebben we essentiële genen geïdentificeerd die betrokken zijn bij het ontstaan van bijvoorbeeld prostaatkanker, botkanker en oogmelanomen. Dit project is een voortzetting van onze huidige onderzoekslijn.</p> <p>Het doel van dit project is het ontwikkelen van nieuwe behandelingen tegen kanker door gebruik te maken van het zebravismodel. Door de fundamentele mechanismen te bestuderen van de migratie van kankercellen, biologie van primaire uitzaaiingen en de interactie tussen kankercellen en de gastheer, kan richting worden gegeven aan nieuwe kankercel- en gastheergerichte therapieën met potentiële klinische toepassing.</p> <p>De specifieke doelstellingen van de aanvraag zijn:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) De zichtbaarheid van het gedrag van de tumorcellen en de gastheer verbeteren om zo tumorgroei, bloedvaat ingroei, tumorverspreiding en de afweerreactie beter te begrijpen. 2) In kaart brengen welke genen en chemicaliën invloed hebben op tumorontwikkeling door verschillende genen in tumorcellen uit te schakelen en door zebravislarven bloot te stellen aan verschillende chemicaliën. 3) Bevestigen dat geïnjecteerde menselijke tumorcellen kunnen verspreiden naar de organen van zebravissen, en dat tumorontwikkeling geremd kan worden door in te grijpen met chemische stoffen en uitschakeling van specifieke genen.
---	---

Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

In dit project wordt het zebrawismodel gebruikt om meer inzicht te krijgen in zowel de moleculaire mechanismen van tumorgroei als tumorremming door nieuwe medicijnen/chemicaliën, waarmee de basiskennis over kankerprocessen wordt vergaard. Een beter begrip hiervan is belangrijk om aanknopingspunten te vinden voor nieuwe behandelingsstrategieën. Kennisoverdracht en kennisbenutting wordt bevorderd door verschillende samenwerkingsverbanden.

VOORSPELDE SCHADE

In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.

Injectie

Zebravislarven van 2 dagen oud worden verdoofd door ze in een kweekschaal te plaatsen met daarin water met opgelost verdovingsmiddel. Kankercellen of kanker-geassocieerde cellen worden geïnjecteerd in de dooier, de bloedbaan of de hersenholte van de larven. Deze techniek wordt micro-injectie genoemd en wordt uitgevoerd met behulp van een microscoop en een kleine glazen naald. Vervolgens worden de larven teruggeplaatst in een kweekschaal met vers water om te herstellen van de verdoving.

Om genen te onderzoeken die invloed hebben op kankerontwikkeling wordt het DNA van kankercellen aangepast in het laboratorium en vervolgens worden deze cellen door middel van micro-injectie in de zebravislarven gebracht wanneer deze 4 dagen oud zijn. Ook worden antilichamen toegediend aan de bloedsomloop van larven die eiwitten remmen die betrokken zijn bij kankerontwikkeling.

Blootstelling aan chemicaliën

Na het injecteren van kankercellen wordt een deel van de larven blootgesteld aan tumor remmende chemicaliën. De larven worden, op dezelfde wijze als hierboven beschreven, onder verdoving gebracht. De chemicaliën worden direct toegediend aan het water in de kweekschaal of ze worden verpakt als nanodeeltjes (liposomen) en in de bloedbaan geïnjecteerd.

Imaging

De ontwikkeling van kanker in de zebravislarven en de effecten van de verschillende ingrepen wordt bestudeerd in levende zebravislarven door ze in detail met de microscoop te bekijken. Hiertoe worden de zebravislarven op verschillende tijdstippen (tot 15 dagen na fertilisatie) gefixeerd en verdoofd in een kweekschaal en onder de microscoop bekeken. Na bestudering worden de larven teruggeplaatst in een kweekschaal om te herstellen van de verdoving.

Einde experiment

Het experiment wordt beëindigd door het doden van de zebravissen ten behoeve van pathologische analyses of omdat het humane eindpunt is bereikt.

Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?

De zebravislarven ondervinden mogelijk licht ongerief van verdoving en injectie. Ervaring heeft ons geleerd dat een klein deel van de dieren (minder dan 5%) injectie niet overleeft. Bij een aantal dieren kunnen zeer snelgroeïende kankercellen leiden tot matig ongerief. Op grond van onze ervaring verwachten we dit bij niet meer dan 15% van alle dieren. Waarneembare ziektesymptomen zullen zich niet langer dan één dag voordoen vanwege dagelijkse inspectie en tijdig doden van lijdende vissen.

Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?

Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig
Zebravissen (Danio rerio)	142280	0	127420	14860	0

Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?

Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren		
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd

Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.

Een deel van de dieren wordt na afloop van het experiment gedood voor pathologische analyses. De overige dieren worden na beëindiging van het experiment gedood om onnodig ongerief te voorkomen als gevolg van toenemende tumorgroei.

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Uit voorgaand onderzoek blijkt dat de aangegeven stadia optimaal zijn voor dit onderzoek. De transparantie in de vroege ontwikkelingsstadia biedt mogelijkheden voor microscopische studies, die niet vervangen kunnen worden door kankermodellen zonder het gebruik van dieren, waar er niet naar interactie met verschillende gezonde cellen kan worden gekeken. Waar mogelijk worden experimenten uitgevoerd in zebrawislarven tot 5 dagen oud. Kandidaat genen en chemicaliën worden in cellen geselecteerd om het gebruik van proefdieren te beperken.</p> <p>Verspreiding van kanker is een complex proces waarbij het gedrag van kankercellen beïnvloed wordt door de dynamische interactie met verschillende gezonde cellen in de omgeving van de gastheer. Op dit moment zijn er geen alternatieven die deze complexe interacties kunnen nabootsen.</p>
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Om het aantal dieren te verminderen, worden GO/NO GO-beslissingen genomen na elke stap van het project waardoor het aantal dieren dat nodig is in vervolggexperimenten geminimaliseerd wordt. Het gebruik van de dieren wordt beperkt tot het minimum dat nodig is voor het verkrijgen van statistisch betrouwbare resultaten. Bovendien wordt de duur van de dierproeven beperkt tot het minimum dat nodig is om statistisch betrouwbare resultaten te verkrijgen, zodat de resultaten mogelijk gebruikt kunnen worden in verdere experimenten met medisch oogpunt. Daarnaast worden zebrawissen die gebruikt zijn in tumorontwikkeling experimenten hergebruikt voor weefselverzameling ten behoeve van analyses.</p>
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>Verdoving wordt gebruikt om het ongerief bij de dieren te verminderen. Doordat er live tumorgroei kan worden geanalyseerd is het mogelijk experimenten direct te beëindigen wanneer het relevante resultaat is bereikt, zodat larven niet nodeloos lang hinder ondervinden door de geïnjecteerde kankercellen. De dieren worden om de dag bekeken; bij afwijkingen als gevolg van lijden worden ze direct gedood.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>De zebrawis is geschikt als model voor humane kanker vanwege de overeenkomsten in zowel tumorstructuur als activiteit van genen. Door de transparantie van zebrawissen op jonge leeftijd, kunnen de uitzaaiingen en de reactie van cellen in het immuunsysteem op de tumorcellen live in beeld gebracht worden. Deze complexe interactie tussen tumor en gastheer kan niet nagebootst en in beeld gebracht worden in niet-dierlijke modellen.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: maandag 9 januari 2023 10:15
Aan: 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202216495

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 19-10-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216495. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Onduidelijkheden

Uw aanvraag is afgelopen vrijdag besproken tijdens de CCD vergadering. Tijdens deze bespreking van uw aanvraag is de berekening van het aantal dieren aan bod gekomen en is besloten hier een aanvullende vraag over te stellen:

- U geeft aan een groepsgrootte van 70 dieren nodig te zullen hebben wanneer rekening wordt gehouden met de verwachte uitval. Dit aantal lijkt vrij hoog. Kunt u aangeven waarom u heeft gekozen voor een dermate groot betrouwbaarheidsinterval (98%)?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

Dear Members of the CCD,

You asked the following:

U geeft aan een groepsgrootte van 70 dieren nodig te zullen hebben wanneer rekening wordt gehouden met de verwachte uitval. Dit aantal lijkt vrij hoog. Kunt u aangeven waarom u heeft gekozen voor een dermate groot betrouwbaarheidsinterval (98%)?

Based on previous experiments (* see below) we have found that to obtain high statistical significance of results $p < 0.02$ between control and treated group using 80% power level, the group size of approximately 65 larvae until 15 dpf (Gr I and Gr II) is needed (1-5). High confidence interval is necessary for consideration of the results obtained in the novel zebrafish cancer models for translation to eventual medical applications.

In general $p < 0.5$ is considered significant chance due to intrinsic variation in zebrafish it is required to calculate results with significance of $p < 0.02$ for high ranking publication. Taking into account that 7% of the larvae normally does not survive up to stage 6dpi, due to the manipulations, we will start with 70 animals per group to make sure we have 65 animals left for analysis. We will perform one to three biological repeats using larvae from different group crossing. In total 65 embryos $\pm 7\% = 70$ will be used for all biological repeats.

*In order to calculate sample size, the following formula will be used:

Sample size = $\frac{((sd \text{ control group})^2 + (sd \text{ experimental group})^2 * Z)^2}{(\text{mean control group} - \text{mean experimental group})^2}$

$Z = (Z_{1\alpha/2} + Z_{1\beta})^2 = 10$ (from Z-table, using 98% CI and 80% power level)

In the control group of a previous pilot study, a fluorescence mean of 100 with a standard deviation (sd) of 45 was found. This number is calculated by dividing total fluorescence intensity by the area.

For the experimental group, we are interested in a mean with at least a 25% reduction, so a mean of 75 and similar sd of 45.

If we input these parameters in the formula, the result is that we need 65 animals per group to be able to acquire statistically significant results.

Since the fish we use are not clonal but are derived by crossing a group of fish there is a considerable margin of error in the measurements. We need to repeat the experiment with another crossing of the fish to be able to see how different the population mean is likely to be from the sample mean.

Input parameters:

- sd: 45
- Minimal detectable effect size: 25% decrease
- Control mean: 100

- Experimental mean: 75
- 98% confidence interval and 80% power level

We have hoped to clarify our calculations in light of our scientific field.

5.1 lid2e

References:

5.1 lid2h, 5.1 lid2e



Advies aan CCD

Datum 11 januari 2023

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216495

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model.
Aanvraagnummer: AVD202216495
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

Proces	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <ul style="list-style-type: none">- In het projectvoorstel verwijst u naar eerder behaalde resultaten onder 5.1 lid2h. Kunt u iets toelichten over de in dit project behaalde resultaten en hoe deze zich verhouden tot de aanvraag die u nu heeft ingediend?- In de bijlage dierproeven onder F geeft u het ongerief per handeling en per experimentele groep weer. Kunt u nog samenvatten welke percentages per ongeriefcategorie gelden voor de bijlage als geheel?- In de bijlage geeft u onder "verfijning" weer dat er anesthesie wordt toegepast. Neemt u nog andere maatregelen om te zorgen dat de dierproeven zo verfijnd mogelijk verlopen? <p>Over de NTS:</p> <ul style="list-style-type: none">- U gebruikt de term euthanasie. De CCD vindt dat het woord "doden" en beter beeld geeft van wat er met de dieren gebeurt. Kunt u de term vervangen?- Er komt in de NTS vakjargon voor en ingewikkelde termen als "ex vivo", "in vitro" en "preklinische resultaten". Kunt u de tekst nog een keer doorlopen en moeilijke termen vervangen of uitleggen?- Onder "verfijning" vermeldt u dat dieren "uit het experiment gehaald worden". Het lot van deze dieren zal voor een algemeen publiek wellicht
---------------	--

	niet duidelijk zijn. Kunt u benoemen dat deze dieren gedood worden?			
	- Kunt u de wijzigingen direct doorvoeren in het verplicht gestelde Excel format en deze bij ons indienen?			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts				
	Zebravissen (Danio rerio)		142.280	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts

Zebravissen (Danio rerio) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaten uit het DEC advies:</p> <p>C1 (samenhang en toetsbaarheid): (...) Het is helder welke handelingen en interventies individuele dieren zullen ondergaan echter het is voor de DEC leden niet goed mogelijk om in te schatten welk ongerief de vissenlarven van de interventies zullen gaan ondervinden. Er is een kennislacune met betrekking tot de daadwerkelijke gevolgen voor de (fysiologie) van ZF larven als er XPD tumorcellen worden ingebracht die uitgroeien tot tumor achtige structuren. Vooralsnog kunnen de meeste DEC leden (6 van de 7), vooral gezien de lange ervaring van de aanvragers met ZF onderzoek, wel 'leven met' de ongeriefclassificatie zoals gegeven door de aanvrager. Het is voor de DEC leden wel duidelijk dat het gebruik van ZF larven veel voordelen biedt voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen.(...)De meerderheid van de DEC is ervan overtuigd dat op zorgvuldige wijze, met behulp van heldere go/no-go momenten, de voortgang van het project beoordeeld wordt waardoor er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Eén lid is van mening dat er geen heldere go/no-go momenten zijn; zie het minderheidsstandpunt.(...)</p> <p>C9 (bijzondere categorieën): (...) De vissen zullen worden gedood volgens de richtlijn 2010/63/EU of dmv een snelle afkoelmethode. Dit is</p>
-------------------	--

naar inziens van de DEC voldoende onderbouwd.

Ethische afweging van de DEC:

1. Rechtvaardigt het onderzoek in zebravislarven naar pathobiologische aspecten van tumor ontwikkeling en – metastasering en naar therapeutische aangrijpingspunten met als uiteindelijk doel het opsporen van moleculaire of genetisch targets om deze tumorprocessen te kunnen blokkeren de inzet en het doden van 142.280 zebravislarven en het cumulatief licht tot matig ongerief dat de dieren wordt aangedaan?

2. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling: het bestuderen van de pathobiologie(tumor initiatie, - differentiatie, - infiltratie en – metastasering) van humane tumorcellen in zebravis larven. De doelstelling is om in dit zebravis model waarin humane tumorcellen worden ingespoten (xenograft) nieuwe medicamenten te testen op hun werkzaamheid.

Waarden die voor proefdieren, de zebravis larven, in het geding zijn: het proefdieronderzoek is nadelig voor de larven als gevolg van het, te verwachten, licht tot matige ongerief, het gedood worden en de aantasting van de fysieke integriteit van het dier.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel door het vergaren van nieuwe inzichten en onderzoeksresultaten, die waarschijnlijk gepubliceerd kunnen worden.

Waarden die voor de kanker patiënten bevorderd worden: een mogelijk groot voordeel omdat de informatie die verkregen wordt in de toekomst van waarde kan zijn voor de ontwikkeling van therapeutische strategieën die de progressie van kanker en de daaraan gerelateerde metastasering van tumorcellen kunnen verminderen.

De meerderheid van de DEC is van mening dat de belangen van de samenleving en die van huidige of toekomstige kanker patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.

Het is evident dat er behoefte is aan nieuwe effectieve kankerbehandelingen die tumor - en patiënt specifiek zijn. Dit voorgestelde onderzoek kan daaraan gaan bijdragen. De DEC acht de voorgestelde onderzoeken in zebravis larven van essentieel belang om inzicht te krijgen in de moleculaire mechanismen van tumorontwikkeling en om nieuwe therapeutisch targets te kunnen identificeren. Hiertoe zullen zebravis larven worden gebruikt. De DEC is van mening dat dit onderzoek niet proefdiervrij kan worden uitgevoerd en vind dat de inzet van 142.280 zebravis larven en het ongerief dat de dieren zullen ondergaan voor dit onderzoek gerechtvaardigd is.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De meerderheid van de DEC is van mening dat de waarden die voor de uiteindelijke doelgroep, de patiënten met kanker, bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft om met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De meerderheid van de DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kan worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren ethisch gerechtvaardigd.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat minderheidsstandpunt: Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Een van de DEC leden geeft een negatief advies. "De hoofdreden om tegen dit onderzoek te zijn is de enorme hoeveelheid dieren die men aanvraagt, terwijl tegenover die hoeveelheid dieren géén hele lage hoeveel ongerief per dier staat. Hieronder geef ik mijn argumentatie in meer detail.

Dat er zoveel dieren aangevraagd worden, heeft er niet alleen mee te maken dat zebravissen een grotere genetische diversiteit vertonen dan bijvoorbeeld muizen die als proefdieren worden gebruikt. De hoeveelheid aangevraagde proefdieren is ook zo hoog omdat het onderzoek heel breed is opgezet. Zoals in de laatste alinea van het project proposal staat samengevat, is men van plan maar liefst vier typen kankercellen, 20 inhibitors, 40 siRNAs en 10 antilichamen te testen. De zebravis wordt door de onderzoekers als 'high-throughput' model gepresenteerd om al deze (waarden van) variabelen te kunnen testen, en dit is blijkens het antwoord op onze vraag 2 de hoofdreden om voor zebravissenonderzoek te kiezen. Het doen van veel dierproeven op veel dieren is daarmee inherent aan de onderzoeksstrategie, en dat staat op gespannen voet met de ambitie om minder proefdieren te gebruiken.

Een hoofdargument dat de onderzoekers geven om zoveel dierproeven te

willen doen is dat ze 'personalized medicine' willen bevorderen. Door zoveel (waarden van) variabelen te onderzoeken, is klaarblijkelijk het idee, kan voor een individuele patiënt worden gekeken op welke onderzoekssituatie zijn of haar toestand het meest lijkt en kan zo de therapie worden bepaald. Zo ingevuld stimuleert het ideaal van 'personalized medicine' het gebruik van veel proefdieren en staat het haaks op de genoemde ambitie om het aantal dierproeven te verminderen (die mijns inziens samenhangt met de erkenning van de intrinsieke waarde van proefdieren).

Het is hier overigens ook van belang dat de go/no-go momenten, zoals ze nu geformuleerd zijn, geen mogelijkheid bieden om het aantal proefdieren te verminderen. Ze dienen niet om te bepalen hoeveel waarden er van bepaalde variabelen worden getoetst, maar alleen welke; het aantal waarden dat getest gaat worden ligt vast. Bij de eerste zogenoemde go/no-go beslissing (zie appendix pagina 3) staat bijvoorbeeld al vast dat er 6 cellijnen en 40 LNPs-shRNAs getest zullen worden en wordt alleen een keuze voor specifieke cellijnen en LNPs-shRNAs gemaakt.

Nergens in het onderzoeksvoorstel of één van de andere documenten wordt beargumenteerd of aannemelijk gemaakt dat zebravislarven bijzonder weinig ongerief van het onderzoek zouden ondervinden. Het aantal dieren dat 'mild' ongerief zal ondervinden wordt op 127.420 ingeschat en het aantal dat 'matig' ongerief zal vinden op 14.860; er is geen sprake van dat 'mild' en 'matig' ongerief voor een zebravislarve iets heel anders zou inhouden dan voor muizen. Gezien de enorme aantallen dieren mag niet te lichtvaardig worden aangenomen dat het met het pijn of lijden van zebravissen wel mee zal vallen, als we dat niet goed weten. Daarnaast is twijfelachtig of het gebruiken en doden van proefdieren op zich ethisch neutraal is, zelfs als alles pijnloos gebeurt. Ook vanuit dat oogpunt is het grote aantal dieren dat is aangevraagd problematisch.

Ik kan me moeilijk voorstellen dat een onderzoek met soortgelijke aantallen muizen positief ontvangen zou worden, en het mag niet zo zijn dat de belangen van zebravissen dan wel zebravislarven minder meegeteld worden dan die van muizen zolang daar geen goede inhoudelijke redenen voor gegeven worden. Die redenen heb ik noch in de aanvraag noch in de bespreking van de DEC voorbij horen komen. Er was bij de DEC wel sprake van een gevoel dat zebravissen er toch minder toe deden (al dan niet omdat hun vermogen tot lijden volgens de persoonlijke inschatting van de spreker beperkt zou zijn), maar de onderbouwing daarvan was zeer beperkt. Naar mijn idee wordt er dus zonder goede gronden een onderscheid gemaakt op basis van soort en dat vind ik ethisch problematisch.

Hoewel ik het onderzoek zeker een substantieel belang toeken – het betreft ernstige aandoeningen die veel voorkomen en ik geloof best dat

	<p>het nieuwe inzichten en betere behandelmethoden kan opleveren – geef ik om de bovengenoemde redenen een negatief advies. De aanvragers hadden mijn inziens genoeglijk moeten aantonen dat zebravislarven een zeer beperkt vermogen om te lijden hebben, óf het onderzoek veel minder breed en met inbegrip van goede go/no-go criteria moeten opzetten, zodat er niet zo ontzettend veel dieren nodig zouden zijn.”</p> <p>De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC: Citaat: Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen duidelijke dilemma's naar voren gekomen. Wel is het voor de DEC leden niet goed mogelijk om in te schatten welk ongerief de vissenlarven van de interventies zullen gaan ondervinden.</p>
--	---

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en volledig. Er is inzicht gegeven in de vragen die zijn gesteld. Bij de onderbouwing van de C vragen gebruikt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op een logische manier uit de antwoorden op de C vragen.</p> <p>Het minderheidsstandpunt is helder weergegeven en goed uiteengezet.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	<p>5.1 lid2e</p> 
--------------------------------	---

3V's

<p>Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.</p>	
---	--

Hergebruik	<p>Er is geen sprake van hergebruik van dieren.</p>
-------------------	---

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts	Ja	niet volgens de richtlijn. Citaat: The zebrafish will be killed using an overdose of the anesthetic Tricaine (this method is described in Annex IV of Directive 2010/63/EU) or by cooling as recently described (Biology 2022, 11(4), 546; https://doi.org/10.3390/biology11040546). The rapid cooling method faster time to death and fewer signs of distress in euthanized zebrafish, we advocate this method as a humane veterinary practice.

Naam proef		
3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts		
Zebravissen (Danio rerio)	Ongerief: 10,4% Matig 89,6% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

De aanvraag is een voortzetting van **5.1 lid2h**. De aanvrager is gevraagd om wat meer toelichting te geven over in dit voorgaande project behaalde resultaten.

Zebravissen en larven worden gedood door overdosis anestheticum of door koeling. Deze laatste methode staat niet in de richtlijn beschreven maar is wel een gangbare methode voor de doding van zebravissen. De instelling heeft een ontheffing van de NVWA om deze methode te gebruiken. De DEC **5.2 lid1**

Eén van de DEC leden heeft een minderheidsstandpunt ingenomen (zie DEC advies). Deze persoon heeft voornamelijk moeite met de brede opzet, het groot aantal dieren dat wordt aangevraagd en het ongerief dat de dieren ondervinden. Daarbij wordt het als ethisch problematisch ervaren dat er onderscheid wordt gemaakt op basis van soort (een vis is kennelijk minder waard dan een muis).

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Naam van het project	De zebravis als model voor ontdekking van nieuwe behandelingen tegen kanker
NTS-identificatiecode	NTS-NL-773958 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	NTS202216495
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	kankerbestrijding kankercellen veelvuldig testen van nieuwe medicijnen genetische modificatie kankercel-immuuncel interactie
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Oncologie Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Kanker bij de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>De zebravis wordt de laatste jaren steeds meer gebruikt als model voor kankeronderzoek. Doordat zebravistumoren veel overeenkomsten vertonen met de mens in hun DNA en cel-eigenschappen is de zebravis een geschikt modelorganisme voor een groot aantal menselijke soorten kanker. Zebravislarven zijn doorzichtig en ontwikkelen zich buiten de moeder wat ze zeer geschikt maakt voor onderzoek. Zo kan in zebravissen de ontwikkeling van uitzaaiingen en de reactie van cellen van het immuunsysteem op tumorcellen in beeld gebracht worden. De combinatie van beschikbaarheid van fluorescente zebravislijnen en gemakkelijke opname van chemicaliën uit het water, zorgt ervoor dat in dit model in een korte tijd fundamentele kennis vergaard kan worden.</p> <p>Wij hebben de afgelopen jaren zebravismodellen ontwikkeld om op grote schaal tumorgedrag te bestuderen en tumoren te beoordelen op gevoeligheid voor geneesmiddelen. Met behulp van deze modellen hebben we essentiële genen geïdentificeerd die betrokken zijn bij het ontstaan van bijvoorbeeld prostaatkanker, botkanker en oogmelanomen. Dit project is een voortzetting van onze huidige onderzoekslijn.</p> <p>Het doel van dit project is het ontwikkelen van nieuwe behandelingen tegen kanker door gebruik te maken van het zebravismodel. Door de fundamentele mechanismen te bestuderen van de migratie van kankercellen, biologie van primaire uitzaaiingen en de interactie tussen kankercellen en de gastheer, kan richting worden gegeven aan nieuwe kankercel- en gastheergerichte therapieën met potentiële klinische toepassing.</p> <p>De specifieke doelstellingen van de aanvraag zijn:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) De zichtbaarheid van het gedrag van de tumorcellen en de gastheer verbeteren om zo tumorgroei, bloedvaat ingroei, tumorverspreiding en de afweerreactie beter te begrijpen. 2) In kaart brengen welke genen en chemicaliën invloed hebben op tumorontwikkeling door verschillende genen in tumorcellen uit te schakelen en door zebravislarven bloot te stellen aan verschillende chemicaliën. 3) Bevestigen dat geïnjecteerde menselijke tumorcellen kunnen verspreiden naar de organen van zebravissen, en dat tumorontwikkeling geremd kan worden door in te grijpen met chemische stoffen en uitschakeling van specifieke genen.
---	---

Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

In dit project wordt het zebrawismodel gebruikt om meer inzicht te krijgen in zowel de moleculaire mechanismen van tumorgroei als tumorremming door nieuwe medicijnen/chemicaliën, waarmee de basiskennis over kankerprocessen wordt vergaard. Een beter begrip hiervan is belangrijk om aanknopingspunten te vinden voor nieuwe behandelingsstrategieën. Kennisoverdracht en kennisbenutting wordt bevorderd door verschillende samenwerkingsverbanden.

VOORSPELDE SCHADE

In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.

Injectie

Zebravislarven van 2 dagen oud worden verdoofd door ze in een kweekschaal te plaatsen met daarin water met opgelost verdovingsmiddel. Kankercellen of kanker-geassocieerde cellen worden geïnjecteerd in de dooier, de bloedbaan of de hersenholte van de larven. Deze techniek wordt micro-injectie genoemd en wordt uitgevoerd met behulp van een microscoop en een kleine glazen naald. Vervolgens worden de larven teruggeplaatst in een kweekschaal met vers water om te herstellen van de verdoving.

Om genen te onderzoeken die invloed hebben op kankerontwikkeling wordt het DNA van kankercellen aangepast in het laboratorium en vervolgens worden deze cellen door middel van micro-injectie in de zebravislarven gebracht wanneer deze 4 dagen oud zijn. Ook worden antilichamen toegediend aan de bloedsomloop van larven die eiwitten remmen die betrokken zijn bij kankerontwikkeling.

Blootstelling aan chemicaliën

Na het injecteren van kankercellen wordt een deel van de larven blootgesteld aan tumor remmende chemicaliën. De larven worden, op dezelfde wijze als hierboven beschreven, onder verdoving gebracht. De chemicaliën worden direct toegediend aan het water in de kweekschaal of ze worden verpakt als nanodeeltjes (liposomen) en in de bloedbaan geïnjecteerd.

Imaging

De ontwikkeling van kanker in de zebravislarven en de effecten van de verschillende ingrepen wordt bestudeerd in levende zebravislarven door ze in detail met de microscoop te bekijken. Hiertoe worden de zebravislarven op verschillende tijdstippen (tot 15 dagen na fertilisatie) gefixeerd en verdoofd in een kweekschaal en onder de microscoop bekeken. Na bestudering worden de larven teruggeplaatst in een kweekschaal om te herstellen van de verdoving.

Einde experiment

Het experiment wordt beëindigd door het doden van de zebravissen ten behoeve van pathologische analyses of omdat het humane eindpunt is bereikt.

Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?

De zebravislarven ondervinden mogelijk licht ongerief van verdoving en injectie. Ervaring heeft ons geleerd dat een klein deel van de dieren (minder dan 5%) injectie niet overleeft. Bij een aantal dieren kunnen zeer snelgroeiende kankercellen leiden tot matig ongerief. Op grond van onze ervaring verwachten we dit bij niet meer dan 15% van alle dieren. Waarneembare ziektesymptomen zullen zich niet langer dan één dag voordoen vanwege dagelijkse inspectie en tijdig doden van lijdende vissen.

Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?

Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig
Zebravissen (Danio rerio)	142280	0	127420	14860	0

Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?

Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren		
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd

Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.

Een deel van de dieren wordt na afloop van het experiment gedood voor pathologische analyses. De overige dieren worden na beëindiging van het experiment gedood om onnodig ongerief te voorkomen als gevolg van toenemende tumorgroei.

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Uit voorgaand onderzoek blijkt dat de aangegeven stadia optimaal zijn voor dit onderzoek. De transparantie in de vroege ontwikkelingsstadia biedt mogelijkheden voor microscopische studies, die niet vervangen kunnen worden door kankermodellen zonder het gebruik van dieren, waar er niet naar interactie met verschillende gezonde cellen kan worden gekeken. Waar mogelijk worden experimenten uitgevoerd in zebrawislarven tot 5 dagen oud. Kandidaat genen en chemicaliën worden in cellen geselecteerd om het gebruik van proefdieren te beperken.</p> <p>Verspreiding van kanker is een complex proces waarbij het gedrag van kankercellen beïnvloed wordt door de dynamische interactie met verschillende gezonde cellen in de omgeving van de gastheer. Op dit moment zijn er geen alternatieven die deze complexe interacties kunnen nabootsen.</p>
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Om het aantal dieren te verminderen, worden GO/NO GO-beslissingen genomen na elke stap van het project waardoor het aantal dieren dat nodig is in vervolggelaxperimenten geminimaliseerd wordt. Het gebruik van de dieren wordt beperkt tot het minimum dat nodig is voor het verkrijgen van statistisch betrouwbare resultaten. Bovendien wordt de duur van de dierproeven beperkt tot het minimum dat nodig is om statistisch betrouwbare resultaten te verkrijgen, zodat de resultaten mogelijk gebruikt kunnen worden in verdere experimenten met medisch oogpunt. Daarnaast worden zebrawissen die gebruikt zijn in tumorontwikkeling experimenten hergebruikt voor weefselverzameling ten behoeve van analyses.</p>
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>Verdoving wordt gebruikt om het ongerief bij de dieren te verminderen. Doordat er live tumorgroei kan worden geanalyseerd is het mogelijk experimenten direct te beëindigen wanneer het relevante resultaat is bereikt, zodat larven niet nodeloos lang hinder ondervinden door de geïnjecteerde kankercellen. De dieren worden om de dag bekeken; bij afwijkingen als gevolg van lijden worden ze direct gedood.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>De zebrawis is geschikt als model voor humane kanker vanwege de overeenkomsten in zowel tumorstructuur als activiteit van genen. Door de transparantie van zebrawissen op jonge leeftijd, kunnen de uitzaaiingen en de reactie van cellen in het immuunsysteem op de tumorcellen live in beeld gebracht worden. Deze complexe interactie tussen tumor en gastheer kan niet nagebootst en in beeld gebracht worden in niet-dierlijke modellen.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

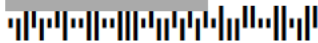
AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
5.1 lid2e
5.1 lid2h



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 5.1 lid2h 202216495
Bijlagen
3

Datum 11 januari 2023
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte drs 5.1 lid2e ,

Op 19 oktober 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 02216495. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 11 januari 2023 tot en met 10 januari 2028.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 22 december 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 28 december 2022 en 9 januari 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op eerder behaalde resultaten, het ongerief, verfijning van de dierproeven, onderbouwing groeps grootte en het verduidelijken van enkele teksten in de niet-technische samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

11 januari 2023

Aanvraagnummer:

AVD 5.1 lid2n 202216495

Overwegingen

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

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een maximale looptijd van 5 jaar heeft.

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 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, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Datum:

11 januari 2023

Aanvraagnummer:AVD **5.1 lid2h** 202216495

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

i.o.

5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl
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:

5.1 lid2h

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 11 januari 2023 tot en met 10 januari 2028, voor het project "Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216495, na advies van 5.1 lid2h De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2e Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 19 oktober 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 4 januari 2023;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts, zoals ontvangen op 4 januari 2023;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 4 januari 2023;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 22 december 2022
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 4 januari 2023, 10 januari 2023.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1. Drug and target discovery in zebrafish xenografts			
	Zebravissen (Danio rerio)	142.280	10,4% Matig 89,6% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste 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:

AVD^{5.1 lid2n} 202216495

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:AVD 5.1 lid2f 202216495

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 blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b 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.

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: maandag 16 januari 2023 11:35
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216495

Geachte 5.1 lid2h

Op 19-10-2022 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Anticancer compound and target discovery in zebrafish xenograft model.' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216495.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op eerder behaalde resultaten, het ongerief, verfijning van de dierproeven, onderbouwing groepsgrootte en het verduidelijken van enkele teksten in de niet-technische samenvatting.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 11-1-2023.

Het DEC advies is helder en volledig. Er is inzicht gegeven in de vragen die zijn gesteld. Bij de onderbouwing van de C vragen gebruikt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op een logische manier uit de antwoorden op de C vragen.

Het minderheidsstandpunt is helder weergegeven en goed uiteengezet. Ook de CCD heeft lang gesproken over het zeer grote aantal dieren maar heeft uiteindelijk toch unaniem besloten de aanvraag te vergunnen.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl