

	Dossier: AVD11500202418434	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	2X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Tegengaan van agressieve vormen van kanker met behulp van stoffen tegen littekencellen, senescence en uitzaaiingen
NTS-identificatiecode	NTS-NL-239068 v.1, 06-01-2025
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Kanker Therapie Uitzaaiingen
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>Uitgezaaide kanker is vrijwel altijd dodelijk, omdat een operatie vaak niet meer mogelijk is en de standaardbehandeling op den duur steeds slechter werkt. Nieuwe therapieën zijn dringend nodig om patiënten met uitgezaaid kanker beter te kunnen behandelen.</p> <p>Het doel van ons onderzoek is (1) om beter te begrijpen hoe kanker uitzaait en (2) om nieuwe stoffen te testen daartegen. Niet herstelde schade kan ervoor zorgen dat cellen eigenschappen krijgen die we omschrijven als "senescent" (= Latijn voor verouderen). Senescente cellen scheiden continue een grote reeks signaalstoffen uit, die op termijn hun omgeving negatief beïnvloeden. Senescente cellen dragen bijvoorbeeld bij aan de veroudering van organen, maar kunnen ook kankergroei bevorderen en zorgen dat kankercellen minder goed reageren op behandeling. Daarnaast hebben we aangetoond dat kankercellen zelf ook deze niet herstelde schade kunnen ontwikkelen, wat ze nog agressiever maakt. Stoffen tegen senescente cellen kunnen dus kanker tegengaan door zowel de agressieve kankercellen te doden, als de omgeving van de kanker te verbeteren.</p> <p>In celweek hebben wij al stoffen getest die veelbelovend zijn in het aanpakken van deze processen. Het doel van dit project is nu dan ook om te onderzoeken hoe niet herstelde schade ontstaat (1), hoe dit tot verschillende soorten senescente cellen bij kanker leidt (2) en te kijken of de door ons ontwikkelde nieuwe stoffen effectief zijn daartegen - in muizen (3). Het uiteindelijke toegepaste doel is om stoffen te maken tegen agressieve vormen van kanker bij patiënten.</p>
<p>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).</p>	<p>Het wetenschappelijke doel van dit project is om beter te begrijpen hoe verschillende soorten senescente cellen zich ontwikkelen in muismodellen voor kanker, bijvoorbeeld in uitzaaiingen of na chemotherapie behandeling. Deze kennis is essentieel voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën.</p> <p>Het maatschappelijke doel van ons onderzoek is het identificeren van nieuwe behandelingen die in de kliniek getest kunnen gaan worden. Dit project zal cruciale informatie opleveren voor het ontwerp van de eerste klinische testen, zoals welke kankersoorten we kunnen behandelen, het voorspellen van welke varianten van een kankertype waarschijnlijk goed zullen reageren, en hoe de therapieën werkten in combinatie met bestaande chemotherapie.</p> <p>Concreet levert dit project het volgende op:</p> <ol style="list-style-type: none">1) Een unieke set weefsels en ander materiaal voor verder onderzoek.2) Inzichten in hoe verschillende soorten senescence ontstaan en hoe deze een rol spelen bij kanker bij muizen.3) Nieuwe stoffen die getest zijn tegen kanker en waarvan de meest veelbelovende hopelijk naar patiënten vertaald kunnen worden.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Om de effecten van de nieuwe therapieën te beoordelen, moeten we eerst kanker laten ontwikkelen in de muizen. Hiervoor is een operatie nodig die plaatsvindt onder narcose en met pijnbestrijding. Dit geldt voor 75% van de dieren. Een operatie duurt maximaal 30 minuten. Verder zal 95% van de muizen injecties krijgen met een nieuwe therapie, een controle of chemotherapie. Deze injecties worden meestal twee keer per week gezet en dit duurt ongeveer tien seconden per injectie. 50% van de muizen wordt maximaal één keer per week gescand om de grootte van tumoren en de aanwezigheid van uitzaaiingen te kunnen bepalen. Dit gebeurt onder narcose en duurt ongeveer tien minuten.</p>																
<p>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?</p>	<p>Voor het onderzoek moeten enkele operaties en metingen plaatsvinden onder verdoving en waar nodig pijnbestrijding. Net als bij patiënten kan dit leiden tot pijn, angst, stress en veranderingen in lichaamsgewicht, gedrag, of conditie. De injecties en scans kunnen leiden tot stress bij de dieren. Een scan wordt onder narcose uitgevoerd en het effect hiervan is hooguit enkele uren te zien aan een verminderde activiteit. Een operatie en bijbehorende narcose kunnen zorgen voor pijn en zwakte, hetgeen twee dagen kan aanhouden. Dit is te zien aan een veranderd gedrag, gewichtsverlies en slechter onderhouden vacht. Aangezien de dieren kanker ontwikkelen, zullen ze hierdoor ook ongerief ervaren. Met name uitzaaiingen kunnen ongerief veroorzaken, wat onder meer te zien is aan gewichtsverlies, verlies van activiteit, een gebogen ruggetje en een slecht onderhouden vacht. Het verwachte ongerief ligt meestal niet hoger dan 'matig'. Dit kan afwijken bij experimenten waarbij naar maximale levensduur wordt gekeken, waarbij dieren vroegtijdig kunnen overlijden, ondanks regelmatige controle van de dieren. In dit geval omschrijven wij dit als 'ernstig' ongerief. Uiteraard is het streven om dit te voorkomen.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"><thead><tr><th rowspan="2">Soort:</th><th rowspan="2">Totaal aantal</th><th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th></tr><tr><th>Terminaal</th><th>Licht</th><th>Matig</th><th>Ernstig</th></tr></thead><tbody><tr><td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td><td>4834</td><td>0</td><td>1636</td><td>2997</td><td>201</td></tr></tbody></table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	4834	0	1636	2997	201
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	4834	0	1636	2997	201												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"><thead><tr><th rowspan="2">Soort:</th><th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th></tr><tr><th>Hergebruikt</th><th>Teruggeplaatst</th><th>Geadopteerd</th></tr></thead></table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De dieren worden niet in leven gehouden na afloop van de experimenten. Deze dieren bevatten kankercellen en zijn daarmee niet (goed) te gebruiken in andere experimenten. Waar mogelijk proberen wij tevens plasma en organen te analyseren, b.v. voor uitzaaiingen. Ook hiervoor moeten de dieren worden gedood.</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

In het kankeronderzoek wordt er veel gebruik gemaakt van cellijnen. Deze zijn zeer waardevol en gebruiken wij om uitvoerig onze nieuwe therapie te testen. Echter, voordat we patiënten kunnen gaan behandelen met experimentele stoffen, moeten we weten of deze een effect hebben in een levend wezen en wat de mogelijke bijwerkingen zijn. Uitzaaïngen ontstaan onder andere door een interactie van kankercellen met hun omgeving. Hoewel dit in beperkte mate te bestuderen is in celkweeken, kan dit doorgaans maar vrij kort en ontstaan er dan ook geen echte uitzaaïngen. Muizen zijn daardoor noodzakelijk om te bestuderen hoe uitzaaïngen ontstaan en het beste zijn tegen te gaan. Ook zijn muizen bijvoorbeeld nodig om te bepalen in welke organen een nieuwe stof terecht komt, hoelang deze daar blijft en welke effecten en bijwerkingen de stof daar heeft. Dit is niet of nauwelijks te bestuderen in celkweek. Door deze variabelen in muizen te bestuderen, is het veel gericht mogelijk studies bij patiënten uit te voeren en weten we beter waar we op moeten letten.

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.

Er zullen eerst pilot-experimenten worden uitgevoerd met een kleine groep muizen om de juiste proefopzet te bepalen. Ook testen we een nieuwe stof eerst in één experiment, voordat we uitgebreidere experimenten gaan doen. Hierdoor wordt de uiteindelijke hoeveelheid muizen verminderd. Waar mogelijk, gebruiken we methoden om in dezelfde muizen meerdere metingen te doen, in plaats van metingen in verschillende dieren. Hierdoor krijgen we unieke informatie per individuele muis. Verder proberen we in één proef veel gegevens tegelijkertijd te verzamelen door middel van speciale meetapparatuur. Tot slot testen we, waar mogelijk, meerdere therapieën in één experiment zodat maar één keer de controlegroepen nodig zijn waarmee we deze therapieën vergelijken.

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.

We gebruiken verdoving tijdens scans en operaties en dienen pijnmedicatie toe voor en na ingrijpende operaties. Deze medicaties zijn gestandaardiseerd voor de handelingen die we uitvoeren, maar worden ook continu geëvalueerd aan de hand van observaties in het gedrag van de dieren na afloop. Behalve door de operaties ondervinden de dieren ongerief door tumorgroei en het ontstaan van uitzaaïngen. We hebben uitvoerige scorelijsten opgesteld om de symptomen hiervan objectief vast te leggen en om te kunnen bepalen of het ongerief te groot wordt.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

We gebruiken muizen voor deze experimenten, omdat er veel bekend is over deze dieren in de context van kankeronderzoek. Er zijn veel protocollen beschikbaar en we hebben veel ervaring in onze groep. Ook zijn muizen makkelijk handelbaar en is het haalbaar om redelijk grote groepen te behandelen en snel te opereren en te scannen. De dieren zullen ongeveer twee maanden oud zijn bij de start van een experiment. Dit omdat hoe ouder de dieren worden, hoe minder ze vergelijkbaar met elkaar zijn – net zoals oude tweelingen ook meer van elkaar verschillen dan jongere tweelingen. In de helft van alle experimenten

beoordelen we het effect van nieuwe therapieën op de levensduur van de dieren. Hierbij kunnen muizen één jaar oud worden als de behandeling goed aanslaat.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-12-2030
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--

Current version: 7.8.202501141645 (25c34dc)Version date: 2025-01-14 16:46:23

[Top](#) | [Contact](#) | [Cookies](#) | [Privacy policy](#) | [Legal notices](#) | [Accessibility](#)



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	11500
		<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	UMC Utrecht
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel Voorletters Achternaam <input checked="" type="checkbox"/> Dhr <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	info@ivd-utrecht.nl
		Titel, voorletters en achternaam van 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	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50
		Postcode en plaats	3584CJ UTRECHT
		Postbus, postcode en plaats	80.125 3508TC UTRECHT
	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

1.5 (Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters

Functie

Senior onderzoeker

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

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

1.7 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn

Telefoonnummer

030-2531569

E-mailadres

info@ivd-utrecht.nl

1.8 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag

Nee

2 Over uw aanvraag

2.1 Gaat uw aanvraag over een *wijziging* op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?

Nee > Ga verder met vraag 3

Ja > Geef hieronder 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 negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?

Nee > Ga verder met vraag 3

Ja > Geef hieronder 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

01-01-2025

Einddatum (t/m)

5 jaar na verlenen vergunning

3.2 Wat is de titel van het project?

Targeting aggressive cancer through treatment with compounds against cell scarring, senescence and metastasis

3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Tegengaan van agressieve kanker met behulp van stoffen tegen littekencellen, senescence en uitzaaiingen

3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

Naam DEC

DEC Utrecht

Postadres

Postbus 85500, 3508 GA UTRECHT

E-mailadres

dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Factuurgegevens

4.1 (Indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam: UU-ASC		Afdeling:	
Straat:			Huisnummer:
Postcode:		Plaats:	
Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA	Plaats: UTRECHT	
E-mail: asc.factuur@uu.nl			

4.2 (Optioneel.) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer: CB.841910.3.01.011

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht	
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel	Aantal bijlage(n) dierproeven 2
<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	[Redacted]
Functie	[Redacted]
Plaats	Utrecht
Datum	17 oktober 2024
Handtekening	[Redacted]



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'.	11500
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht
1.3 Provide the title of the project.	Targeting aggressive cancer through treatment with compounds against cell scarring, senescence and metastasis

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic research
	<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
	<input type="checkbox"/> Regulatory use or routine production
	<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal
	<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
	<input type="checkbox"/> Higher education or training
	<input type="checkbox"/> Forensic enquiries
	<input type="checkbox"/> 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.

Definitions

ADME: Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion. Assays to address the properties fo a compound, or DevCan, in vivo before clinical translation can commence. Sometimes combined with Toxicity into ADMET.

Senescence: A phenotype that occurs in response to irreparable cellular damage and which leads to a SASP. Senescent cells are typically apoptotic resistant and accumulate during aging. Their accumulation can be accelerated by damaging treatments, such as small molecules and chemo-/radiotherapy.

Not all senescent cells are the same (like not all cancer is the same) and there are differences in the composition of SASP factors. There are common denominators, however, in that senescent cells generally are devoid of proliferation and positive for stress markers. One particularly relevant subtype for this application is that of "scarred" senescence / cancer.

Not all senescent cells are the same (like not all cancer is the same) and there are differences in the composition of SASP factors. There are common denominators, however, in that senescent cells generally are devoid of proliferation and positive for stress markers.

TME: Tumor Micro Environment. The local niche of cells surrounding tumor cells in the stroma. Although certain factors can be anti-tumorigenic when present briefly, SASP factors secreted by senescent cells in the TME generally lead to a pro-tumorigenic / pro-metastatic effect on cancer cells

Background

Problem definition / unmet medical need:

Although therapeutic options have evolved, late-stage metastatic cancer remains a leading cause of death worldwide. These cancers are often irresectable through surgery, leading to a standard-of-care of immunotherapy, kinase inhibitors, and chemo- or radiotherapy. While these treatments can prolong survival, they often are only effective for a limited time, in part due to the development of therapy resistance. Consequently, when cancer cells have metastasized to distant sites, the prognosis is particularly poor and there is a tremendous unmet medical need to find alternative solutions.

Aim:

The aim of this project is to advance the development of novel therapeutics against those types of cancer that have become aggressive due to signaling by senescence-like pathways either within these cells, or by the stromal cells flanking them. The reason this is important is because those cancer cells tend to become cancer stem cells and metastatic. These chronically damaged cells have many features of cellular senescence and especially when they show features of scarring, we have evidence they can be targeted by [REDACTED]. By studying the Mechanism of Action and attempting to eliminate them, we thus aim to address the unmet medical need.

Scientific rationale: Exploiting weaknesses in senescence pathways in cancer cells and their stroma as a novel opportunity to target aggressive cancer.

Cellular senescence occurs in response to irreparable cellular damage and results in development of a pro-inflammatory phenotype that alters the microenvironment [2]. This low level, but chronic type of secretion is called the SASP; Senescence Associated Secretory Phenotype. Senescence within tissues can promote cancer growth, migration and therapy resistance [3] [4]. In turn, genetic clearance of chemotherapy-induced senescent cells proved to inhibit metastasis formation[5]. In addition to senescence in the tumor microenvironment, we have shown that cancer cells can develop features of senescence (our unpublished data). In that case, the cancer cells keep on dividing while producing SASP factors, thereby creating a feed-forward loop and making them even more aggressive. Ironically, it was found that many types of standard-of-care, such as small molecules and chemo-/radiotherapy can trigger a SASP and their detrimental secretory phenotype *in vivo*[3] [4]. Thus, targeting senescence-like pathways shows promise against cancer progression, especially of those tumors that are particularly aggressive due to SASP.

This argues for development of anti-senescence therapies against cancer progression. However, a complication in development thereof is that not all senescence and, by proxy not all SASP, is equal. This argues for developing individual approaches. Here, we will explore a selected number of pathways and their associated therapeutic agents, with a focus on compounds against "scarred" cells. These develop elevated forms of

A second focus lies on targeting cancer cells that obtained senescence-like properties due to hyperactivation of [REDACTED]. A third focus lies on targeting senescence-like cancer sensitive to changes in metabolism in [REDACTED] and for which we also developed CPPs.

1. Compounds eliminating scarred cells have potential in the treatment of multiple aggressive cancer types
Senescence markers and especially scarring markers as [REDACTED] can be found in tumor microarrays (TMAs) from patients with a variety of cancers, including colorectal, breast and ovarian cancers. We observed that approximately 25% of tumors contained a significant number of these scarred cells, which was even higher in patients with aggressive subtypes or late-stage metastatic cancer. Furthermore, *in vitro* experiments demonstrated that chemotherapy can increase the number of these chronically damaged cancer cells, promoting resistance to a consecutive dose. Taken together, targeting senescent-like cancer cells is a promising strategy for the treatment of drug-resistant cancers across multiple cancer indications.

In projects [AVD1150020199124](#) and [AVD11500201991245](#), as well as in published studies [REDACTED] we have previously shown that targeting senescent cells can improve the healthspan of mice. To target these cells, we had developed [REDACTED] that breaks the interaction between [REDACTED]. This proved to induce a potent apoptotic response and showed convincing selectivity against senescent cells compared to healthy cells.

Since then, we have come to understand that scarred cells are particularly enriched in phosphorylated forms of p53. This led us to develop [REDACTED] which differs from the original [REDACTED] the sense that it is very specific for scarred senescence and scarred cancer. Based on *in vivo* safety and PK data, we also developed a backup compound, [REDACTED] shows less acute toxicity, whereas [REDACTED] shows less long-term toxicity. As the acute safety can well be addressed, [REDACTED] is currently being pursued as "development candidate", with [REDACTED] remaining the backup candidate. We have extensively tested these compounds and found them to be effective against cell lines from multiple cancer indications as well, including colorectal, ovarian, lung, liver, pancreatic and triple-negative breast cancer, as long as biomarkers are present. This forms the rationale for this CCD project to target senescent, SASP-producing, stroma and senescent-like themselves against a range of aggressive cancer types.

In previous *in vivo* experiments ([AVD1150020199124](#)) our aim was to assess the efficacy of multiple compounds targeting senescent-like cancer cells, which were selected based on *in vitro* potency and selectivity. To this end, we first needed to establish robust mouse models and determine the optimal treatment regimen for these compounds. Focusing primarily on colorectal cancer (CRC) and triple-negative breast cancer (TNBC), we implanted these cancer cells orthotopically to allow a primary tumor to grow at a relevant site. Metastases were observed to develop spontaneously and reproducibly.

Using these optimized models, we conducted extensive experiments to test the treatment schedule, dosing, and efficacy of the compounds. The optimal treatment schedule was determined to be twice weekly, and this schedule is now applied in all experiments. We observed a decrease in primary tumor growth in two distinct TNBC models and a reduction in the number of liver and lung metastases. Additionally, the overall survival was prolonged in the model that was tested. In the CRC model, the compounds also reduced the number of metastases and were particularly effective in combination with chemotherapy. Based on additional Pharmacology and safety studies performed at external Contract Research Organization, we have now selected a development candidate, [REDACTED] and a sister version [REDACTED]. Both are effective against aggressive cancers at a safe dose. These 4th generation compounds have been selected for clinical translation, but are also still being optimized further into a [REDACTED] and which will also be taken along in the project.

2. Compounds against other senescence-associated pathways show direct potential *in vitro* and *in vivo*:

As mentioned, not all senescence is equal and we are also pursuing alternative compounds that are effective against other types of senescence and senescence-like cancer. For one, we developed a highly potent CPP called [REDACTED] used very similar structural properties as [REDACTED] in the sense that it is also an alkaline D-Retro-Inverso amino acid CPP. However, whereas [REDACTED] is specific against scarred cells, [REDACTED] is not. [REDACTED] In doing so, [REDACTED] for lysosomal degradation. A first experiment in an [REDACTED] looked promising, but far more research is needed before being able to consider clinical translation.

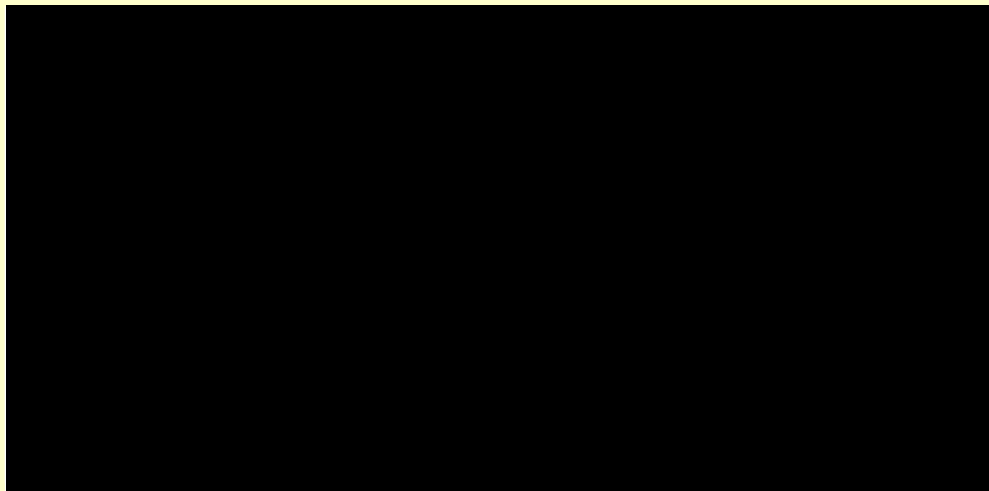
3. Compounds in early R&D-phase against other senescence-associated pathways

In addition to these more established compounds, we also designed and tested several other CPPs in vitro. These are directed against metabolism of senescent and cancer cells, such as [REDACTED] and [REDACTED]. In these cases, we will follow a "go/no-go" decision tree before deciding on whether and how to test them in vivo, taking the 3Rs into consideration.

In conclusion, we will here test the potential of targeting aggressive forms of cancer through CPPs designed to interfere with senescence-related pathways, primarily:

- [REDACTED]

For the current project several important questions remain, as summarized in 3.2 and the following figure:



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

The ultimate goal for this project is twofold:

- (I) To identify how senescence-associated pathways cause regular (dormant) cancer cells to become aggressive (metastatic) cancer stem cells *in vivo*
- (II) To prepare compounds targeting damaged "senescent-like" cancer cells and stroma for clinical translation.

To achieve these, we have these immediate subobjectives:

- 1) to identify how cancer stemness, and the metastatic potential of cancer cells develop *in vivo*, in response to SASP-producing stroma and how this is enhanced by anti-cancer treatment. This may lead to the development of new compounds we will test *in vitro* and *in vivo*. Here, we will employ both our established models for colorectal and triple-negative breast cancer, as well as new models we will optimize in this project. These models will be the same as we use for the translational goal, since we expect these cancers to express biomarkers such as [REDACTED]
- 2) to optimize the treatment opportunities and dosing schemes for the development candidate, [REDACTED] or derivatives, for a clinical trial. This involves testing its efficacy on other CRC and breast cancer subtypes, as well as testing new indications. These new indications have been selected based on *in vitro* studies and include ovarian carcinoma, hepatocellular carcinoma, melanoma and pancreatic cancer. The results of these studies will inform decisions about indications to include in a clinical trial;
- 3) to determine the effectiveness of [REDACTED] in combination with established therapies. Several of these, such as the DNA-damaging agents Doxorubicin, '5-FU and platinum drugs, but also small molecules as CDK inhibitors, can induce persistent damage *in vitro*. *In vivo*, many of these have been described to induce senescence and, as such, we will assess whether these invoke a SASP-enriched stroma (I), cancer stemness and migration/metastasis (II) and sensitivity to CPPs as [REDACTED]
- 4) to explore the potential of anti-senescence compounds in our development to combat the spread of benign or early tumors into metastatic cancer. This includes [REDACTED] Comparable to what is described for point 2+3.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

The project is a continuation of previously performed and ongoing *in vivo* experiments, i.e. from [AVD1150020199124](#) (and to an extent [AVD1150020199125](#)). We have ample experience with CDX (cell-line derived xenografts), PDX (patient-derived xenografts) and GEM (genetically engineered mouse) models. Moreover, we have multiple article 13f2 technicians and article 9 researchers that oversee the project design and proper execution. We also obtained funds from several academic grants, public-private initiatives and industrial/commercial financing for preclinical development of compounds like [REDACTED]. The set-up of this project was such that we would first perform small pilot experiments and thereafter more developed large-scale experiments. As such, we are here able to employ mouse models which we have already used multiple times in our lab and which we understand well. For new models, we will again first perform small pilot experiments to get acquainted. Importantly, all experiments will be performed by well-trained animal technicians and scientists – seniority of which is clear from the fact that they are involved in local training and handling exercises.

In addition to the technical feasibility of the project, we also believe that the stated objectives are achievable. We have a wealth of 2D and 3D *in vitro* data showing that signals from SASP factors can change cancer cells into a more aggressive phenotype. For clinical translation, mouse data are required, but it is likely that these processes are conserved. We identified the models that can be used and the circumstances under which our novel compounds are effective. Furthermore, we have accumulated the knowledge required to make informed decisions regarding the appropriate timing for proceeding with an experiment and when not to. (*see also the go-/no-go decision moments in the schedule below under 3.4.1*).

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.

Click or tap here to enter text.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

The scientific goal of this project is to get a better understanding of how senescence/SASP biomarkers develop in vivo and how these drive cancer progression, metastasis formation and therapy resistance. Therapy resistance is the result of an interplay between intrinsic changes in both surviving cancer cells and alterations in the tumor microenvironment (TME). These can paradoxically facilitate the outgrowth of surviving cancer cells and accelerate metastasis formation. We have shown that both tumor and surrounding cells can express scarring biomarkers and knowledge on how to target these detrimental cells is desirable to develop better translational therapies.

Societal relevance

The overarching objective of our research is to identify novel therapeutic agents that can be translated to the clinic against hard-to-treat types of cancer. This project will provide invaluable information for the design of the first clinical trial, including the identification of cancer indications to be targeted, the prediction of which subtypes of a cancer type are likely to respond well, and the timing of the trial in relation to existing chemotherapy. Preclinical research, such as PK/PD, ADME and toxicity studies are outside of the scope of this project but are performed at Contract Research Organizations in parallel.

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

Conducting a large animal experiment to test novel compounds against therapy-resistant cancer cells involves several key stakeholders, including:

Cancer Patients: patients would ultimately benefit from successful research and new treatments.

The animals involved in the project: While we strive to investigate as much as possible in vitro, some animal experiments in mice (and later, beyond this project, rats and non-rodent mammals) are needed before clinical translation can commence. This means these animals will be exposed to a disease, in our case cancer, or treatment that may cause discomfort, and ultimately killed.

Scientists: the project will advance knowledge on the presence and development of scarred cells in mouse models for multiple indications. This will contribute to mechanistical insights on therapy resistance and metastasis formation in a systemic setting. Thus, the results of cell culture experiments can be validated in a more complex system.

Public and private funding agencies: we receive public financing through academic grants and public-private-initiatives, as well as private funding from investors. Moreover, through this CCD license, those funders will be able to bring their therapies to the clinical and expand knowledge on scientific Mechanisms of Action. These partners seek progress in scientific advancement or therapeutic translation, as well as in fast(er) implementation of therapies – which would be much harder, if not currently impossible, without these animal experiments presented here.

This CCD project contains in vivo experiments for several projects. Many of these are academic, but several of them are also because of preclinical development into the clinic. Some of those are co-sponsored by industry / private partners, all geared towards making such clinical translation feasible. This sometimes means that certain experiments need to be expanded once successful, for instance using a different concentration of dosing scheme. Industrial partners and investors see many animal experiments. To ensure continuation of these projects and proper preclinical development of a compound, it sometimes needs to be thoroughly examined, e.g. vs. standard of care, or to see if a different dosing frequency can yield better results. Such decisions are not taken lightly and only if we consider changing parameters to be impactful do we consider a rerun of such an experiment.

Biotech company: the biotech company conducting (part of) this research has a direct interest in the successful development and validation of novel compounds against therapy-resistant cancer cells to generate robust preclinical data that can support the transition to human clinical trials. Success in this project could lead to the advancement of the company's pipeline, resulting in new therapeutic products for cancer treatment.

UMC Utrecht: both the translational and scientific components of this project are relevant to the UMC Utrecht. The project will advance knowledge on cancer progression and therapy development, which will contribute to publications and research grants. Furthermore, the clinical trial following this project would take place in the UMC.

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.

The aim of this project is to evaluate the efficacy of novel compounds against therapy resistance in cancer cells by targeting cells that exhibit senescence markers. To achieve this, we have separated the experiments in two appendices:

Appendix 1

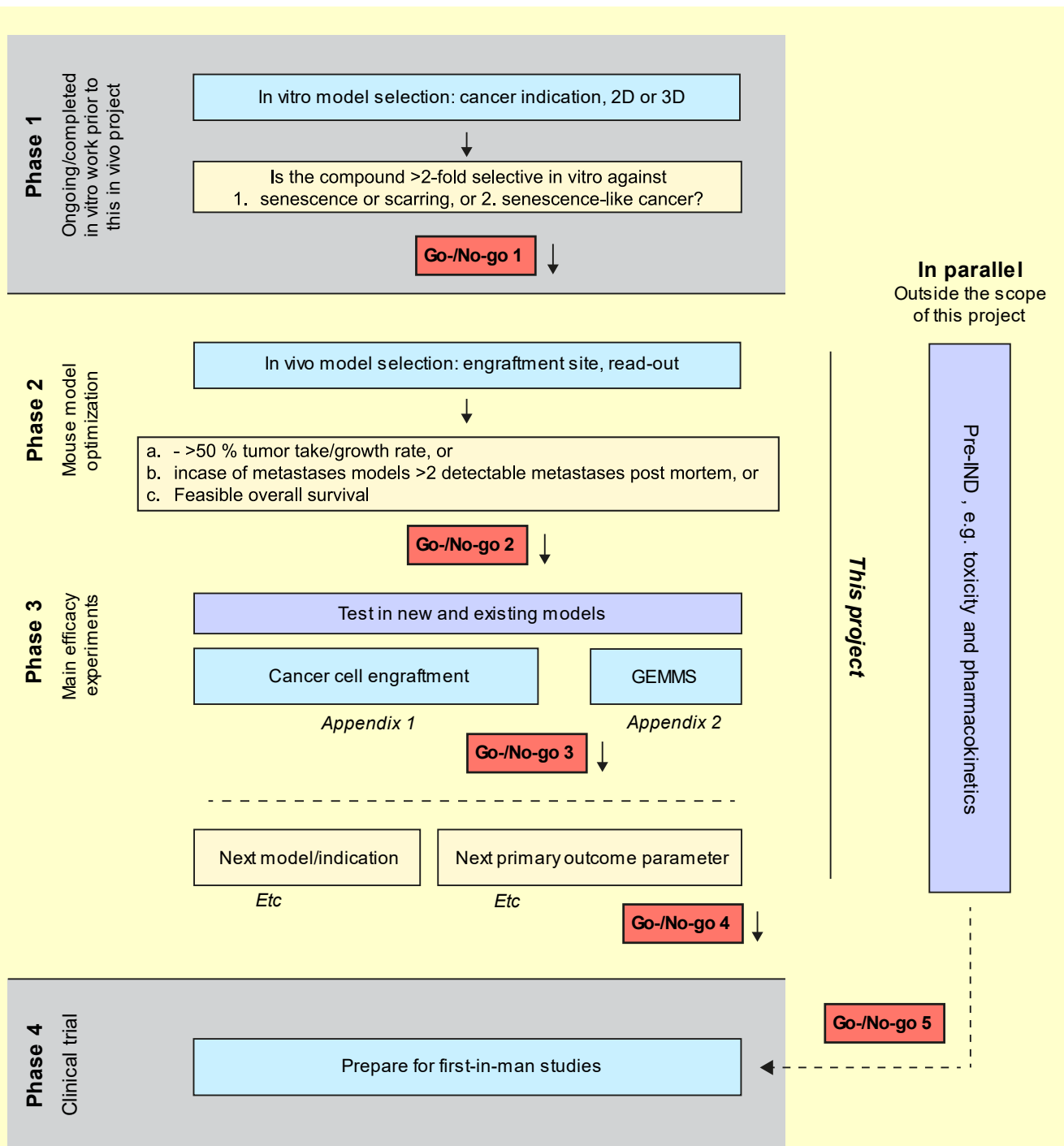
- 1) Primary tumor models. Here we will transplant (patient-derived) cancer cell lines (CDX) or 3D organoids (PDX). These will be grafted at either a relevant site or subcutaneous on the left flank. Relevant sites are, for example, breast cancer cells in the mammary fat pad and colorectal cancer cells in the colon.
- 2) Metastasis models. Here, metastases are formed spontaneously from a primary tumor or cancer cells will be injected into the bloodstream to promote accelerated metastasis formation. Primary tumors will again be grafted at their relevant site and may be resected to mimic a clinically relevant scenario.

Both model types contain a preliminary part during which a model is tested for the take rate of the cancer cells and the variation in the number of metastases or rate of tumor growth.

Appendix 2

Genetically Engineered Mouse Models (GEMMs) to study colorectal cancer and high-grade serous ovarian carcinoma. GEMMs replicate cancer progression more closely since tumors and metastases will occur spontaneously. This enables us to study disease progression and interactions within the tumor microenvironment in more detail, and test new therapies in this context.

The proposed strategy for the entire program looks as follows (where Phase 2+3 are part of the *in vivo* project described in this proposal):



Phase 1

The first go-/no-go benchmark of the project is to ensure that our compounds exhibit sufficient potency and selectivity *in vitro* against the cancer indication of interest to justify further investigation *in vivo*. Prior to initiation of the *in vivo* experiments of this project, we will therefore address *in vitro*. Development of advanced *in vitro* models is also a part of this Phase 1. For instance, we make use of (iPSC-)derived 3D multicellular structures, mostly liver and kidney. Furthermore, we also test the compounds in 3D organoid systems. The combination of 2D, 3D and iPSC-derived multicellular models will allow for a determination of whether a compound is sufficiently efficacious to progress into phase 2. We will use the following pass/fail criteria:

Go-/no-go 1: at least 2-fold selectivity in reducing either viability vs. healthy cells (1), or 2-fold reduction in SASP (3), or 2-fold reduction in migration (metastasis potential) (3).

For example:

- A. For development candidate [REDACTED] we obtained ample evidence that this compound is selective against cells harboring [REDACTED] a.k.a. Scarred senescent and scarred cancer cells. This compound has therefore already passed the go-/no-go criteria. A new version in the evolution of [REDACTED] would need to show superior selectivity and/or efficacy. For instance, by reducing the concentration needed.
- B. [REDACTED] Also this compound has therefore already passed the go-/no-go criteria.

With regard to compounds in earlier development

- C. [REDACTED] we obtained evidence that [REDACTED] is reduced and late-stage tumor progression organoids can selectively be eliminated vs. healthy or early stage equivalents.
- D. For [REDACTED] we obtained preliminary indications they can invoke a [REDACTED] signaling. We will further examine the effects against cancer progression, migration and treatment selectivity and, if sufficiently changed, progress to *in vivo* experiments. [REDACTED] has been coined as tumor suppressor. Indeed, when we overexpress [REDACTED] in colon cancer organoids, we see decreased proliferation and increased differentiation, effectively stopping the organoids to grow. However, this phenomenon only occurs [REDACTED] of which we have previously shown that binding to its [REDACTED] is not needed to be functional. Strikingly, the presence of [REDACTED]. We therefore will test [REDACTED] function as tumor suppressor.
- E. [REDACTED] These are designed to trigger the immune system to attack the tumor *in vivo*.
- F. As this is a long-term project, we would also keep the option to test new compound in early development (or yet to be developed), based on these selection criteria

For the choice of CDX to examine *in vivo*, we will determine which 3D patient-derived cancer organoids, or 2D cell lines exhibit the biomarkers that we assume to predict sensitivity to the treatment, i.e. positivity for cell scarring [REDACTED]. For new compounds, this remains to be determined. Thus, we will select lines for new *in vivo* models.

Given that some compounds, e.g. [REDACTED] are more effective when the senescent or cancer cells show elevated levels of [REDACTED], these *in vitro* experiments may include a combination treatment with standard-of-care chemotherapy. We have shown that therapies such as DNA damaging treatments or small kinase inhibitors may induce [REDACTED] in cancer cells, increasing sensitivity to [REDACTED]. If this is the case in the cell line of interest, a combination-therapy group is added to *in vivo* experiments.

Phase 2

The second phase of the project is focused on establishing robust *in vivo* cancer models. In appendix 1, we employ (patient-derived) cancer cell lines that showed sensitivity to our compounds *in vitro*. If a SASP-producing stroma is relevant to the model, we will engraft (senescent) fibroblasts in addition to the cancer cells. In these pilot experiments, we will determine if a cancer line exhibits a sufficient take rate, an optimal growth rate and form a sufficient number of metastases, when metastasis models are required. These are the minimal number required, but we aim for an even higher take rate, growth rate and number of metastases.

Go-/no-go 2: >50% of injected mice should form tumors or metastases, and a workable tumor should arise between 2 weeks and half a year.

Phase 3

In the third phase of the project, we will test the efficacy of our compounds in either the optimized cancer mouse models from phase II, or models we previously established. In case of a new cancer mouse model, [REDACTED] will first be examined for efficacy against overall survival or tumor growth/metastatic burden. This will be examined in monotherapy and in combination with chemo-radiotherapy. The choice will depend both on phase I and II.

The following pass/fail criteria will be applied:

Go-/no-go 3:

- >20% overall survival benefit, or:
- >20% reduction in the number of metastases or in primary tumor volume

Outcome parameters

- Primary tumor growth. Tumor size will be measured by either caliper measurements or bioluminescence imaging techniques (primarily FLUC/RLUC, on occasion CT, SPECT/PET, 18F-FDG).
- Metastasis formation will be determined by bioluminescence imaging or through post-mortem tissue stainings.
- Lastly, an important measurement of treatment effect is overall survival. In this case, mice are sacrificed when their humane endpoint is reached, and survival is measured in days after cancer cell implantation.

Combination treatments

In principle, the mentioned compounds will first be examined for monotherapeutic efficacy. However, since standard-of-care may create the conditions for the compounds to be more effective, we will also examine their potential in combination with chemo-radiotherapy. For these treatments, we will rely on clinically relevant procedures to mimic the most relevant scenario for patients. We will work closely with clinicians to ensure that the protocols we use *in vitro* and *in vivo* are similar to those used in the clinic. For example:

- [REDACTED] DNA-damaging treatments enhance the biomarkers for [REDACTED]. For colon cancer, we will thus also examine their potential in combination with '5-FluoroUracil and MAPK pathway inhibitors.
- [REDACTED] through feedback mechanisms. This is clinically relevant, as patients are often treated with those, especially in case of colon cancer and melanoma. The potential of [REDACTED]
- [REDACTED] It is not yet clear how chemotherapy affects [REDACTED] and which combination may work best with [REDACTED]. This will be examined *in vitro* and, when adding to go-/no go criteria Phase 1, implemented in this phase.

Depending on whether a compound passes go/no-go criteria 3, we will either continue testing the compounds in the same model with a different read-out, employ a new cancer line of the same indication, or move on to a distinct cancer type. All experiments will be performed in optimized models.

Phase 4

The final phase of our project is clinical translation, which is beyond the scope of this proposal. The Phase 3 experiments will give us crucial information on which cancer indications to include in a first clinical trial. We will also have a better understanding of which subgroups of patients are likely to respond to therapy, based on the presence of scarred biomarkers. Finally, we will have information on possible synergistic effects of standard-of-care ~~the combination~~ of chemotherapy with our novel compounds.

We have outsourced a wide range of pre-clinical studies to determine PK/PD, bioavailability, etc. Extensive toxicity studies required for clinical trial approval are ongoing in parallel with the proposed project.

Go-/no-go 4: Similar criteria as go-/no-go 3, but in additional models. We expect to need positive data in at least 3 models

Parallel Phase (external Contract Research Organization):

Even if we obtain successful efficacy data through experiments in this CCD license, or from 3rd party efficacy experiments, it is not yet a given that a compound can be tested in clinical trials. Once the compound has sufficiently passed efficacy and early safety testing, it is then called a development candidate, or DevCan.

For a DevCan to actually proceed into clinical trials, it needs to be assessed for safety/toxicity in GLP- (Good Laboratory Practice) - Tox studies. The guidelines of the European Medicines Agency (EMA) or the American Food and Drug Administration (FDA) typically require this to be conducted in one rodent and one non-rodent species. The latter often being Non-Human Primates, but sometimes other species. While mice are ideal for small efficacy work, they are less suitable for GLP-Tox work as many parameters are more challenging to measure. Therefore, non-GLP work can often be conducted in mice in order to get a rough idea of where and when toxicity may occur. However, for GLP-TOX, the rodent species of choice is typically rat.

Ultimately, the Medicines Evaluation Board (MEB; in Dutch: College ter Beoordeling Geneesmiddelen; CGDB), decides on market approval of a DevCan – why at that point becomes labeled as a drug. As such, it is the combined advice from the EMA/FDA with the MEB that dictates how these studies will look like for a DevCan. These studies are specifically designed to investigate toxicity and therefore it is not uncommon to pass this stage. However, if a DevCan turns out to have severe or unexpected side-effects at low doses (e.g. close to efficacious dose), this may severely delay its translation, or kill the project altogether.

Go-/no-go 5: Positive evaluation of safety data in at least one rodent and one non-rodent species (often non-human primates). If a DevCan shows extreme or unexpected toxicity at doses close to efficacious dose, this may qualify as a no-go.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

- A) CPPs are a promising class of anti-cancer therapeutics. We obtained strong *in vitro* evidence that at least 4 CPPs can target specific types of cancer. Both in 2D and 3D cancer organoids. For clinical translation to be considered, *in vivo* experiments are a must.
- B) An important criteria for our studies is that we make use of biomarkers to predict sensitivity to the compounds. They are not randomly tested *in vivo*, but applied, based on a rationale. This will reduce unnecessary *in vivo* experiments.
- C) The prime focus lies on targeting “scarred” senescent and cancer cells, which produce a SASP that promotes tumor proliferation, migration/metastasis and therapy resistance. As such, we will examine [REDACTED] (and novel compounds) in specific cancer indications where their the biomarkers for these processes are prevalent.
- D) In the clinic, new compounds will typically be combined with standard-of-care, or be administered thereafter. To assess the effectiveness of these compounds in combination with established therapies, we will here explore how scarred and therapy-resistant cancer cells develop and how these compounds can best be combined.

The described strategy will contribute to these goals:

- 1) First, we preselect mouse models based on literature. We then perform small pilot experiments (see schedule above), to determine which models are the most robust, i.e. reasonably low variability, reasonable timeframe in which tumors/metastases develop and post-mortem positivity for biomarkers. By selecting the right models with relevant outcome parameters, we will know whether the compounds show *in vivo* effectivity in indications where scarred cells are prevalent. Consequently, we can know which cancer (sub-) types to include in a clinical trial.
- 2) *In vitro* experiments will provide us with relevant chemotherapy combinations and treatment schedules for the mouse experiments. These combination treatments in mice will provide valuable

information for clinical translation, as patients enrolled in a trial will invariably have received prior treatment.

- 3) All experiments will provide us with tissues we can stain for biomarkers of scarred cells. This includes material from untreated tumors (pilot mice), mice pre-treated with standard-of-care therapies only (interim cohorts or control groups), and mice who received a combination treatment. Consequently, it is possible to assess when scarred cells occur and whether novel therapies reduce their incidence.
- E) Implementing a multi-phase strategy that begins with *in vitro* testing and progresses to carefully selected *in vivo* models aligns well with the principles of the 3Rs:
- 4) By conducting initial screenings *in vitro*, the number of cell lines tested in *in vivo* models is greatly reduced. We will know which cancer cell lines of which indications are expected to respond best to treatment and will only continue with a select number of these. Furthermore, the novel compounds that progress to animal testing is limited, since only the most potent compounds will be advanced.
- 5) The most effective treatment schedule for the combination of novel compounds with standard-of-care therapies can be easily determined *in vitro*, allowing us to perform optimized *in vivo* experiments. Thus, these experiments will be very focused.
- 6) The number of animals used in full scale experiments is reduced by the selection of reliable models that show limited variation. This is achieved by performing pilot experiments first.
- 7) Prior to performing further experiments, it is first necessary to determine the potential of our compounds in a new indication. This will be achieved by performing one experiment, which will then inform the decision as to whether to proceed with testing more read-outs or more cell lines.
- 8) Tumor size and metastasis formation will be determined longitudinally (e.g. through bioluminescence imaging or calliper measurements), decreasing the amount of independent groups that need to be compared. Thus, both the number of mice and variability within an experiment is reduced.

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	Analysis of the efficacy of novel compounds in cancer, starting from cancer cell engraftment
2	Analysis of the efficacy of novel compounds in cancer, starting from genetically engineered modified mice (GEMMs)
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.

1. Campisi, J., *Aging, cellular senescence, and cancer*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 685-705.
2. Coppe, J.P., et al., *A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9188.
3. Hernandez-Segura, A., S. Brandenburg, and M. Demaria, *Induction and Validation of Cellular Senescence in Primary Human Cells*. J Vis Exp, 2018(136).
4. Krtočila, A., et al., *Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(21): p. 12072-7.
5. Demaria, M., et al., *Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse*. Cancer Discov, 2017. **7**(2): p. 165-176.

6.

■

8. Abou-Ghali, M. and V. Lallemand-Breitenbach, *PML Nuclear bodies: the cancer connection and beyond*. Nucleus, 2024. **15**(1): p. 2321265.
9. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-868.
10. Kops, G.J., et al., *Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B*. Nature, 1999. **398**(6728): p. 630-634.
11. Kops, G.J., et al., *Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress*. Nature, 2002. **419**(6904): p. 316-321.
12. de Keizer, P.L., et al., *Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence*. Cancer research, 2010. **70**(21): p. 8526-36.
13. Chung, Y.M., et al., *FOXO3 signalling links ATM to the p53 apoptotic pathway following DNA damage*. Nature communications, 2012. **3**: p. 1000.



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'.

11500

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

UMC Utrecht

1.3 List the serial number and type of animal procedure

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

Serial number	Type of animal procedure
1	Analysis of the efficacy of novel compounds in cancer, starting from cancer cell engraftment

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.

This appendix describes the assessment of novel compounds in xenograft cancer mouse models, where the primary readouts are tumor growth, metastasis formation and overall survival.

As described in the project proposal, the entire project consists of four phases:

- In **Phase 1** cell lines and novel compounds are evaluated *in vitro*
- In **Phase 2** mouse models are optimized
- In **Phase 3** the efficacy of novel compounds is assessed in optimized mouse models
- In **Phase 4** the novel compounds are tested in patients

We aim to assess the efficacy of our lead compound [REDACTED] as well as [REDACTED] CPPs, and a maximum of four novel compounds. In previous experiments (CCD license AVD1150020199124), we have shown the lead compound to be effective against colorectal cancer and triple negative breast cancer (TNBC) metastases. In this project we aim to further determine its potential against a range of cancer indications. These are selected *in vitro* by assessing the presence of biomarkers for [REDACTED] sensitivity in cancer patient tissues and cell lines (**Phase 1**). We have selected ovarian, liver, melanoma, and pancreatic cancer as additional cancer indications of interest.

In **Phase 2**, pilot experiments will be conducted with cancer cell lines from these cancer indications that express the biomarkers of interest. We will determine if they have a sufficient take rate and standard deviation. Primary outcome parameters are tumor growth, take rate, number of metastases formed and the presence of biomarkers of drug sensitivity.

Criteria for a model to be used in a full experiment (phase 3):

- A sufficient take rate is defined as 50% of the mice developing a primary tumor (when the objective is to test compounds against primary tumors) or 50% of the mice developing metastases (when the objective is to test compounds against metastases). Achieving this threshold is essential to ensure the model's reliability, as a lower take rate would result in an excess of unused animals.
- We will proceed with models that exhibit an optimal growth rate, which is to say that cancer progression is neither too rapid nor too slow. This balance is crucial to allow sufficient time for therapeutic intervention and monitoring, and avoiding overly aggressive progression that may lead to experimental complications. Too slow tumor progression will lead to too much variation. The optimal timeframe for cancer progression in these mouse models is between three weeks and half a year.
- We will calculate the required group sizes to achieve statistically significant conclusions based on the primary outcome parameter, using data from these pilot experiments. For overall survival studies, we will only proceed if group sizes of 25 or fewer can be used; for all other experiments, a maximum of 10 mice per group will apply. This approach minimizes group sizes to ensure efficient resource use, reduce animal numbers, and uphold ethical standards, while still providing robust and reliable data.

These represent the minimum criteria; however, in the event that multiple cell lines are tested simultaneously, the cell line exhibiting the highest take rate and the least variation will be used.

In **Phase 3**, we will assess the efficacy of our compounds in the optimized models against primary tumor and/or metastases. Primary outcome parameters are tumor size, overall survival, or number of metastases. Often novel anti-cancer drugs are designed as an adjuvant to traditional chemotherapy or need to be applied in combination with another novel therapeutic agent. Therefore, a combination of interventions may be applied in the described experiments. This depends on *in vitro* experiments. The type of chemotherapy will be selected based on the cancer cell line or PDX used in these experiments. In addition, the bioavailability of novel compounds can be evaluated in this phase, with the primary outcome parameters being drug levels and localization over time.

The general set-up of the proposed experiments looks as follows:

In all experiments (phase 2&3):

- 1) The mice will be weighed and receive ear marks. Animals of 6-12 weeks will be used.
- 2) Cancer cells will be implanted orthotopically, subcutaneously, or directly into the bloodstream. These cells can be patient-derived cancer cells, established cell lines, organoids, or mouse cancer lines. Some of these contain a fluorescence or firefly luciferase construct, facilitating the assessment of cancer progression through imaging.
- 3) Cancer progression will be measured:
 - a. A primary tumor can be measured with calipers or imaging techniques such as bioluminescence imaging, Fluorescence Molecular Tomography (FMT), Positron Emission Tomography (PET), and single Photon Emission Computed Tomography (SPECT). Imaging will be conducted at less frequent intervals (max every week for fast growing tumors, every month for slow growing tumors). Most cancer cells contain a fluorescent and luminescent label, which we will use to confirm tumor cell transplantation as well as follow tumor growth. When cells are not labeled, a radioactively labeled tracer (^{18}F -FDG) will be injected to determine tumor growth.
 - b. Metastasis formation can be assessed through imaging techniques or through the scoring of health parameters (see 5).
- 4) In some experiments we will draw blood and collect feces and urine. This will be done to assess organ function, circulating tumor DNA, and treatment pharmacokinetics and toxicity (in B and C).

- 5) We will assess health parameters twice a week to determine cancer progression and resulting discomfort. This will be done according to a standardized welfare scoring list. This list will guide the decision to increase the observation frequency or when a humane endpoint (HEP) is reached.
- 6) The mice will be sacrificed either when their HEP is reached for overall survival experiments or at the same time when primary outcome parameters such as the number of metastases is of interest. In all experiments, tissue samples are obtained to study organ morphology, apoptosis, and the presence of biomarkers for compound sensitivity.

In phase 3:

- 7) The mice will be randomized based on weight or baseline tumor luminescence signal when applicable.
- 8) Treat with:
 - a. A control (PBS or NaCl)
 - b. A novel compound
 - c. Appropriate standard-of-care chemotherapy, such as alkylating agents, antimetabolites, and kinase inhibitors.
 - d. Chemotherapy followed by, or in parallel with a novel compound. Treatment strategies may include multiple treatment rounds.
- 9) Cancer progression is monitored as in (3) during and after the treatment period.
- 10) Blood, feces, and urine may be sampled before treatment, after an initial chemotherapy round and after treatment with the novel compound. Organ function, circulating tumor DNA and compound concentrations can be measured in these samples.
- 11) Sacrifice as in (6)

In bioavailability experiment of phase 3:

In a cohort of mice independent of (8), treat control mice and/or tumor-bearing mice with one round of a compound to determine their uptake kinetics and distribution. After treatment, the mice will be sacrificed at predetermined time points and organs are processed to determine the presence/localization of the drugs over time.

Examples of typical experiments (phase 2):

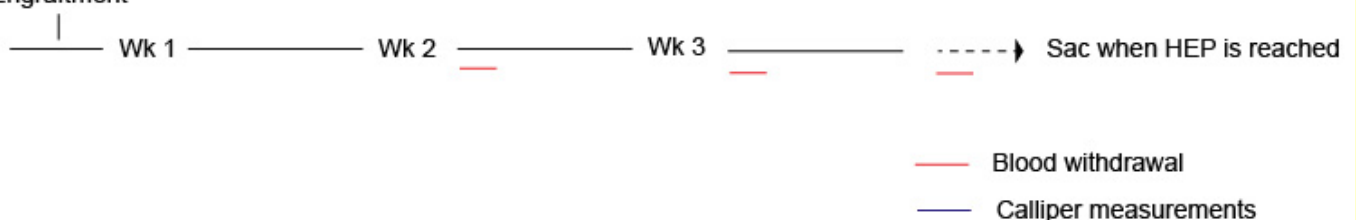
Pilot to assess take rate and number of metastases

Engraftment



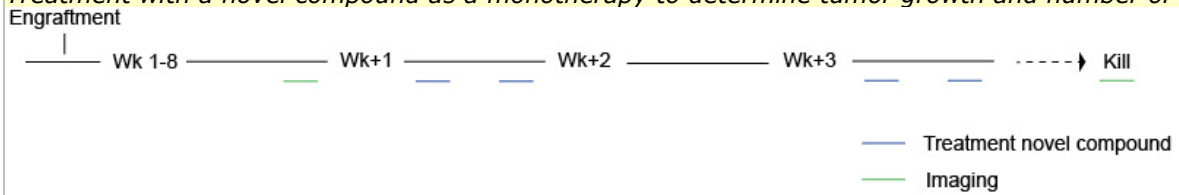
Pilot to assess overall survival after engraftment

Engraftment

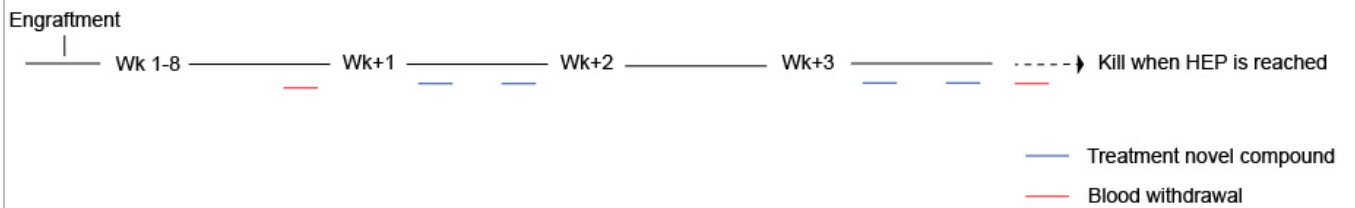


Examples of typical experiments (phase 3):

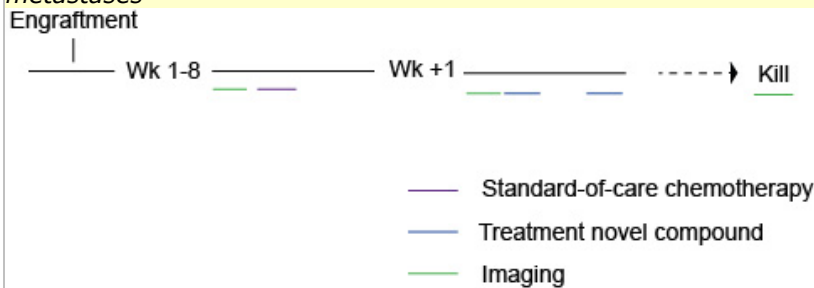
Treatment with a novel compound as a monotherapy to determine tumor growth and number of metastases



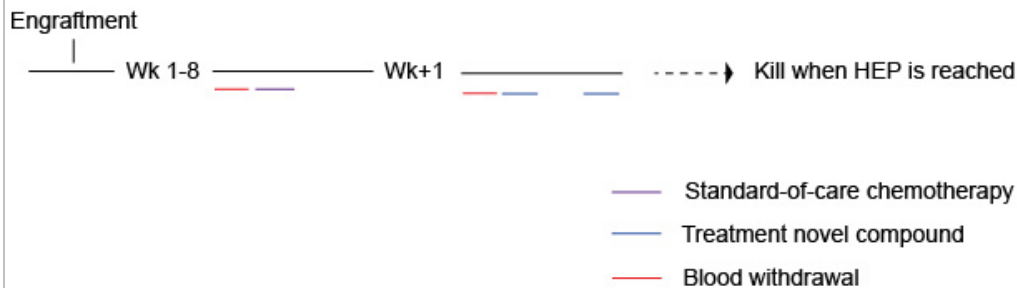
Treatment with a novel compound as a monotherapy to determine overall survival



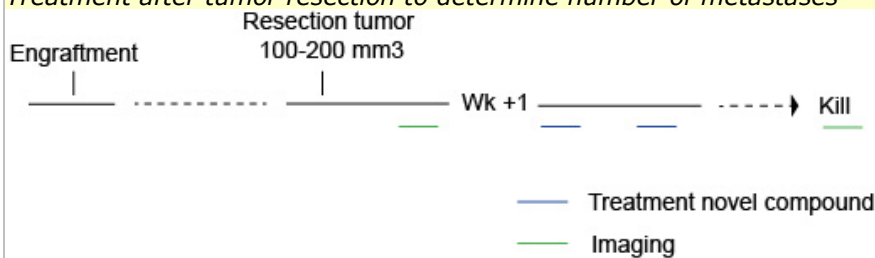
Combination treatment with standard-of-care chemotherapy to determine tumor growth and number of metastases



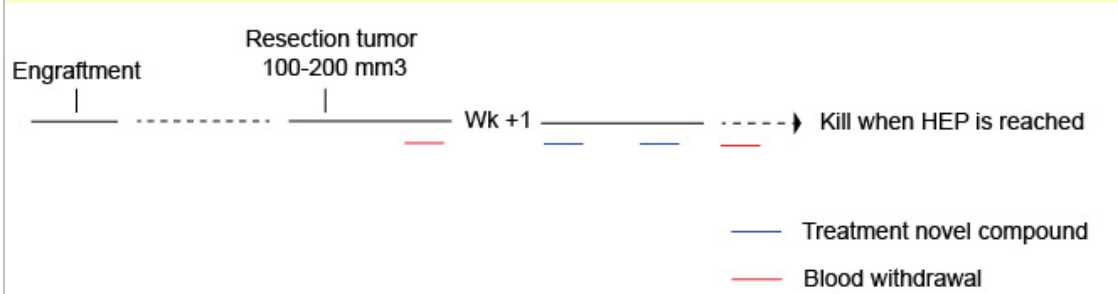
Combination treatment with standard-of-care chemotherapy to determine overall survival



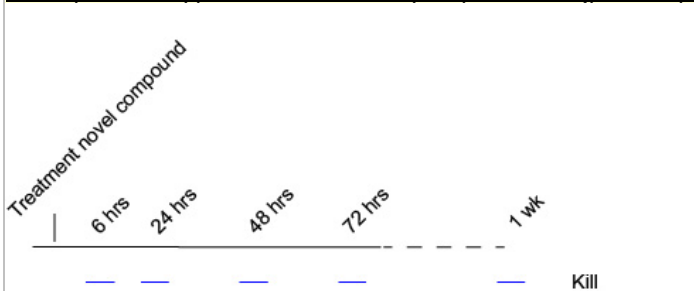
Treatment after tumor resection to determine number of metastases



Treatment after tumor resection to determine overall survival



Example of a typical bioavailability experiment (part of phase 3):



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

Cancer cell engraftment

Cancer cells are engrafted into mice of 6 weeks to 26 weeks old. These cancer cells may be established cancer cell lines, patient derived xenografts (PDX), or 3D tumor organoid cultures. The selection criteria for these are *in vitro* sensitivity to our novel compounds, a high take rate, and a high metastasis rate (known from pilot experiments, from literature and from collaborators). Cancer cells can be engrafted in three distinct ways:

- 1) Subcutaneous injection to assess primary tumor growth. This method is reproducible, fast and the tumor size is easy to measure. A suspension of up to 100 μ l containing $0.5-3 \times 10^6$ cells and up to 50% Matrigel or 50% collagen in media or PBS will be injected under isoflurane sedation. The cells are injected into a single site in the flank, where they are least likely to interfere with locomotion.[1]
- 2) Orthotopic implantation to study primary tumor growth in a relevant environment and spontaneous metastasis formation. Examples of relevant sites are:
 - For colorectal carcinoma: injection into the caecum
 - For mammary carcinoma: injection into the mammary gland
 - For ovarian carcinoma: injection into the ovarian bursa

A suspension of up to 100 μ l or a collagen droplet of max 10 μ L will be implanted containing $0.1-3 \times 10^6$ cells. The engraftment will be performed under the appropriate anesthetic and the animals will receive proper pain medication before and after the surgery. The temperature of the mice will be controlled using heating mats and lamps, and breathing will be monitored. For implantation in the abdomen, a laparotomy is required. To minimize complications and pain after the surgery, all abdominal organs are handled using cotton buds and kept moist by applying warm sterile NaCl.

We aim to refine orthotopic implantation protocols, i.e. by injecting under ultrasound guidance. This eliminates the need for laparotomy and greatly reduces discomfort. To this end, extra mice for training and refinement of this technique will be added to this appendix. This method can be applied to liver and pancreas engraftment[2].

- 3) Injection of a cancer cell suspension (max 100ul) into the bloodstream to model the formation of metastasis in the absence of a primary tumor. The timing of metastasis formation is more precisely controlled, and the injection can be tailored to target specific organs. The cancer cells will be injected

into the tail vein or portal vein. The latter will be performed via laparotomy, in accordance with the procedures outlined in (2).

All procedures are performed by well-trained personnel under sterile conditions.

Primary tumor resection

Primary tumor resection will mainly be performed on breast cancer tumors. Here, the whole mammary gland where the tumor resides in is resected under appropriate anesthesia and the wound is closed with stitches. The animals receive adequate pain medication before surgery and the day after. This procedure is performed once per experiment.

Imaging

Imaging techniques are employed to quantify the volume of internal tumors and the presence of metastases following the injection of cancer cells. Subsequently, the tumor volume is monitored to determine the anti-tumor effects of the administered intervention. To avoid undue stress on the animals, this procedure is performed no more than once a week [3]. In long overall survival experiments (>3 months), we will image maximum once a month.

The mice will be anesthetized during imaging using isoflurane. When mice need to be unconscious longer than 10 minutes, their temperature will be controlled using heating mats and lamps, and breathing will be monitored. Imaging will usually take 5 to 10 minutes and will never exceed 2hrs [3]. A substrate or tracer (see explanation below) is injected when applicable prior to imaging. Subsequently, the animals are anaesthetized, the abdomen is shaved, and imaging is performed.

The imaging techniques we will include:

- Bioluminescence imaging using the BioSpace Imager. This will be the most common approach, as it is rapid and multiple of our cell lines have been genetically modified to express the luciferase reporter construct. To produce the bioluminescence signal, luciferase oxidizes its substrate luciferin. Therefore, we inject the mice with this luciferin substrate prior to imaging.
- FMT to detect fluorescence. This technique has a higher resolution than bioluminescence imaging and can therefore be applied to study tumor progression in specific areas (e.g. liver metastases).
- We can employ PET/SPECT when tumor cells are not luminescent or fluorescently labeled. In this case a ^{18}F -FDG tracer is injected prior to imaging.

Assessment health parameters

The mice are weighed, and health parameters monitored twice a week and scored according to our standardized welfare scoring list. This list was made in accordance with FELASA guidelines [4] and refined based on our own experience. The scoring list rates the clinical signs and their severity, resulting in an overall health score for each mouse. This health score determines whether the observation frequency needs to be increased or whether a humane endpoint is reached. When, according to the scoring list a HEP is reached, the mouse is euthanized, and organs are harvested.

Examples of symptoms that are scored are:

- Loss of more than 15% of body weight within 2 days or 20% in total. Alternatively, visible weight loss when overall body weight remains stable: visible ribs and spinal cord.
- Signs of excessive tumor growth: severe loss of activity, labored breathing, cold/blue extremities, ruffled fur, a hunched posture, increased circumference of the abdomen (as a sign of ascites), closed eyes, self-mutilation, loss of ability to eat or drink.
- Tumor characteristics: ulceration, necrosis, interference with locomotion.

Some clinical signs are universal to all cancer models utilized, whereas others are exclusive to a specific cancer indication or site of implantation. E.g. colorectal tumors frequently result in the formation of ascites and a reduction in body weight, while mammary tumors can cause locomotor problems. For new models developed in the pilot phase (Phase 2), the welfare scoring list is closely evaluated prior to the start of the experiment to

determine if it meets the OBSERVE guidelines for the model [1]. During the experiment, clinical signs will be closely observed and monitored to determine if all observed symptoms are present on the list.

An example of a Welfare checklist is as follows. Note that this is a live document that can be periodically updated:

PROCEDURES LIST – INDIVIDUAL ANIMAL (TABLE 5 B WORK PROTOCOL)					
Clinical signs	Severity				
	0	0.1	0.4	4	
Coat	Smooth	Patches of hair pilo-erected	Majority of back is ruffled	Ruffled Fur	
Anaemia & Hypothermia	Optimal	Slight, not quantifiable by eye	Pale mucous membranes	Cold, pale or blue extremities	
Eyes	Open	Not fully open, possibly with secretions	Eyes half closed Possibly with secretions	Eyes closed or milky	
Weight	Optimum Hip bones, ribs and spinous processes are palpable with gentle pressure but not generally visible	Lean Overlying muscles give the hips a more firm feel	Thin Minimal fat reserves Spinous processes are easily palpable	Emaciated Very prominent, easily palpable and likely visible spinous processes and ribs, little of no flesh covers dorsal pelvis	
Level of activity	Normal amount Mouse eats, drinks, climbs, runs	Active but avoids standing upright: Hunched Posture	Mouse moves when provoked; difficulty getting food or water	Mouse is stationary when provoked; uses cage for support	
Respiration quality	Optimal	Brief moments of labored breathing	Labored no gasping	Labored with intermittent gasps	
Respiration rate	Normal, rapid	Rare, not quantifiable by eye	Severely reduced respiration	Extremely reduced >1 s between breaths	
Tumor size	Slight, not quantifiable by eye	Small tumors next to the hind leg	Large tumor Open wound but healing	Large tumor that interferes with locomotion with an open wound the mouse scratches constantly	
Tumor burden	None	Slight, not quantifiable by eye	Enlarged lymph nodes or spleen	Bloodstained discharge from any orifice	
Total score 1:					
PROCEDURES LIST – INDIVIDUAL ANIMAL (TABLE 5 B WORK PROTOCOL)					
Additional scoring related to the tumor burden					
4	4	0			
Failure to eat or drink over a 48h period	Incontinence or diarrhea over a 48h period	None of the two observations			
Total score 2:					
STEP 3					
The individual mouse score = 10 - Total score1 - Total Score 2					
Score	10	10 - 8	5-7	0-4	0
Health	Optimal	Decreased	Bad	Very bad	Terminal disease
Observation frequency	Usual	Usual	Every day	Twice/day	HEP is reached
Action		Place food inside cage	Weigh mouse Go to Step 4 then recalculate score	Weigh mouse Go to step 4 then recalculate score	Contact Researcher
STEP 4					
Weight loss chart					
1	-1	HEP	HEP		
Normal	<10%	15% maintained for 72h	20% rapid or consistent from the start		

Collection of urine, feces, and peripheral blood.

Urine, feces, and peripheral blood will be collected at the beginning of an experiment, an intermediate point (e.g. before start of treatment), and before sacrifice. Blood will be collected from an appropriate site with a max volume 100ul[5]. Urine and feces will be collected by placing the mouse on parafilm. At least 50ul Urine and one solid piece of feces will be collected. This is done within reason and should not lead to moderate discomfort. Repeat after 24hrs if unsuccessful.

Therapeutic intervention

Treatment is started either right after engraftment to assess the effect on tumor growth, when a primary tumor of 100 to 200 mm³ has formed, or after the primary tumor is resected when interested in metastasis.

Chemotherapy and our novel compounds will be administered via subcutaneous injection, intravenous injection, intraperitoneal injection, or via oral gavage max volumes according to Diehl et al [5].

Our lead compound [REDACTED] will be administered twice per week, on a biweekly basis. This is based on previous experiments in which the optimal dose and frequency were determined. In the case of fast-growing tumors, the mice will be treated every week. Similarly, novel compounds will also be administered twice per week, unless there is *in vitro* evidence to suggest otherwise.

The treatment frequency and duration of standard-of care chemotherapy vary per intervention and is based on literature or knowledge of our collaborators. A rough estimate is between 1 to 3 doses in one week for a maximum of 4 weeks.

Maximum frequency and discomfort of procedure per type of experiment

	Discomfort per occasion	Duration of discomfort	Frequency	Cumulative discomfort
S.c. implantation of cancer cells to form a primary tumor				Mild
S.c. cancer cell engraftment	Mild	10 min	Once, but results in tumor growth	Mild
Primary tumor resection	N/A	N/A	N/A	N/A
Imaging	N/A	N/A	N/A	N/A
Assessment health parameters	-	-	Standard twice a week, max twice a day based on overall health score	-
Collection of urine, feces, and blood	Mild	10 min	3 times over the whole experiment (max once a week)	Mild
Therapeutic intervention	Mild	5 min	Depends on the treatment, max once a day.	Mild
Orthotopic implantation of cancer cells where mice are sacrificed at a predetermined timepoint				Moderate
Cancer cell engraftment	Mild in fat pad, moderate when laparotomy is required	1 to 2 days	Once, but results in tumor growth and metastasis formation	Moderate
Primary tumor resection	Moderate	1 day	Once	Moderate
Imaging	Mild	30 min	Max once/week	Moderate
Assessment health parameters	-	-	Standard twice a week, max twice a day based on overall health score	-
Collection of urine, feces, and blood	Mild	10 min	3 times over the whole experiment (max once a week)	Mild

Therapeutic intervention	Mild	5 min	Depends on the treatment, max once a day	Mild
Orthotopic implantation of cancer cells where overall survival is the primary outcome parameter				Moderate or severe (in case of accidental death)
Cancer cell engraftment	Mild in fat pad, moderate when laparotomy is required	1 to 2 days	Once, but results in tumor growth and metastasis formation	Mild in fat pad, moderate when laparotomy is required
Primary tumor resection	Moderate	1 day	Once	Moderate
Imaging	Mild	30 min	Max once/week, once/month in experiments taking longer than 3 months	Moderate
Assessment health parameters	-	-	Standard twice a week, max twice a day based on overall health score	-
Collection of urine, feces, and blood	Mild	10 min	3 times over the whole experiment (max once a week)	Mild
Therapeutic intervention	Mild	5 min	Depends on the treatment, max once a day.	Mild

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

The number of animals will be minimized by:

- Testing novel compounds extensively *in vitro*. Compounds will only be tested in mice when they show sufficient potency against cancer cell vs normal cells (Go-/no-go point 1).
- Cancer cell lines will only be engrafted in mice if they express relevant biomarkers and are sensitive to a novel compound *in vitro* (Go-/no-go point 1).
- Pilot experiments are conducted to determine whether a novel cancer cell line exhibits a sufficient take rate and propensity for forming metastases in a manner that is reproducible (Go-/no-go point 2).
- Performance of a statistical power analysis to determine the mice needed for further experiments. Here, we will use the Sigma and Delta based on literature, or the above-mentioned pilot experiment(s) (for Sigma). If needed, a statistician is consulted.
- Longitudinal imaging will be performed, so fewer separate cohorts are needed.
- When possible: testing of multiple novel compounds in parallel, since this reduces the amount of control groups necessary

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	Mus Musculus	Commercial breeder	6-52 weeks	4090 in total for (1) and (2)	Male and Female	Yes, immunocompromised	NU/J, NOD/SCID

2	Mus Musculus	Commercial breeder	6-52 weeks		Male and Female	No	C57BL/6, BALB/c
Provide justifications for these choices							
Species	Mice are employed in this study since models of cancer in mice have been well-established. Moreover, they are straightforward to care for, image, and accommodate larger group sizes.						
Origin	It is more cost-effective to purchase mice from an authorized commercial breeder						
Life stages	To reduce variation, tumor cells will be engrafted in mice aged between six and 12 weeks. In experiments investigating overall survival in mice with slow-growing tumor lines, it is possible for the animals to live until they reach one year of age.						
Number	<p>Because we make use of go-/no-go moments, we will only proceed with compounds that are promising and which pass the in vitro stages in go-/no-go moment 1 (phase 1 of the project). When entering the in vivo part of this project, we thus envision the following numbers:</p> <p><u>Phase 2 (until go-/no-go moment 2): max 72.</u></p> <p>In this phase several models will be tested and need to be optimized. A model is defined by a specific (patient-derived) cell line injected. We will evaluate tumor take rate and growth in 4 mice per model. We aim to study 6 distinct cancer types (colorectal, breast, ovarian, liver, melanoma, and pancreatic) and expect to require 3 separate (patient-derived) cell lines per type. However, although we will only use cancer cell lines that are expected to have both a sufficient take rate and growth rate (based on literature or knowledge from our collaborators), it is expected that not all cancer cell lines will be optimal. To a lesser extent, we also need mice to replicate existing protocols to see how well they work in our own hands. Therefore, we envision testing a maximum of 18 cancer cell lines, most of which will be "new". The selection of these lines will depend both on how well our compounds target these lines in vitro as on previous knowledge about the take rate and growth rate of these lines.</p> <p><u>Phase 3a (until go-/no-go moment 2): max 550.</u></p> <p>Based on the pilot experiments we will calculate group sizes needed to reach significant conclusions. We will use GPower software to calculate group sizes, using a one-tailed t-test (since we expect a beneficial effect of treatment) when comparing 2 groups and an ANOVA for multiple groups. When comparing multiple groups, we will apply a Bonferroni correction. For overall survival experiments, we will apply a log-rank test. The primary outcome parameter of interest and the variation observed in the pilot experiment will determine the input values. We will only proceed with experimental designs that employ a maximum of 25 mice per group for overall survival experiments and a maximum of 10 mice per group for all other experiments.</p> <p>Literature shows that metastasis models used in overall survival experiments often exhibit high variability, making it challenging to accurately assess therapeutic effects. While larger group sizes can help detect statistically significant differences in these variable models, if more than 25 animals are required, it may indicate excessive variability or a therapeutic effect too small to be biologically relevant. This threshold is supported by several publications (e.g [6-10]) describing both the models we currently use and potential future models that use groups of 20 to 25 mice. In previous studies, we have not used more than 14 animals per group, based on power calculations from pilot experiments. Although we do not expect to reach 25 animals per group frequently, this may occasionally be necessary for new models.</p> <p>This approach is intended to reduce the number of animals used while maintaining the integrity and reliability of the data. These numbers are based on experience and include attrition of mice due to unexpected lack of tumor growth or experimental complications. In general, the attrition rate is expected to be no more than 10%, but if complex procedures (e.g. a laparotomy) are required, the attrition rate is expected to be no more than 20%. We anticipate this to remain equal or lower than 14 per group. As described in the project proposal, we will first test:</p>						

- ██████ in one new mouse model for a cancer indication we did not test before. This requires two groups of max 25 mice: one control and one ██████ group (=50 total)
- ██████ in combination with standard-of-care chemotherapy in one model. This requires four groups: a control, ██████ a chemotherapy treated group, and a group treated with a combination of chemotherapy and ██████ (= max 100 mice in total per experiment).
- Novel compounds, such as ██████ are first tested in monotherapy in one model. Assuming a maximum of 8 different compounds to be tested (with the respective control groups), this requires 16 groups of max 25 mice (=400 total).

Phase 3b (until go-/no-go moment 3): max 3360

When the initial experiments are successful, more cancer types will be tested (max 6) and more cell lines from the same cancer type (max 2). Furthermore, two readouts per model will be assessed in two distinct experiments (overall survival and number of primary tumor size/metastases). We envision a maximum of 25 mice per group for overall survival experiments and a maximum of 10 mice per group for all other experiments in this phase as well.

- We envision maximally an additional 12 models (max 2 cell lines for max 6 cancer types; we test two lines per indication if we believe the response to therapy differs between subtypes (based on in vitro experiments)) tested with ██████ with two readouts per model (overall survival and primary tumor growth or number of metastases at a predetermined time point). This would be max 12 experiments with max 50 mice (control+treatment) for overall survival (=600), and max 12 experiments with max 20 mice for one other readout (=240).
- We perform one chemotherapy combination experiment per indication with two readouts. = 6 experiments with max 100 mice (control, ██████ chemotherapy, chemotherapy+█████ for overall survival (= 600), and 6 experiments with max 40 mice for one other readout (=240).
- We will employ a maximum of 3 models for maximum 4 new compounds with two readouts. This would be max 12 experiments with max 100 mice (control, ██████ chemotherapy, chemotherapy+█████ for overall survival (= 1200), and 12 experiments with max 40 mice for one other readout (=480).

Phase	Experiment	Mice per group	Cancer cell lines	Experimental groups	Compounds	Max # mice
1	In vitro	-	-	-	-	0
2	Pilot	4	18	1	-	72
3a	█████ monotherapy	25	1	2	1	50
3a	█████ + chemotherapy	25	1	4	1	100
3a	Novel compound monotherapy	25	1	2	8	400
3b	█████ monotherapy	10	12	2	1	240
3b	█████ monotherapy overall survival	25	12	2	1	600
3b	█████ + chemotherapy	10	6	4	1	240
3b	█████ + chemotherapy overall survival	25	6	4	1	600
3b	Novel compound + chemotherapy	10	3	4	4	480
3b	Novel compound + chemotherapy overall survival	25	3	4	4	1200

	Total	3982
	<p>Total number of mice in experiments= 3982</p> <p><u>Training (max 108 mice)</u></p> <p>Next to the mice in the experiments, we require a number of mice to train new personnel on existing techniques and to train all personnel on new techniques (e.g. for refinement).</p> <p>- Existing techniques include procedures specific to this license, such as subcutaneous engraftment of cancer cells, orthotopic transplantation of cancer cells in the mammary fat pad or abdominal organs, and resection of a primary tumor. We expect a maximum of two new employees to be trained in 6 procedures. Each procedure is first trained on cadavers, but subsequently on max 4 living mice. =2*6*4=48 mice.</p> <p>- New techniques include engraftment of cancer cells with ultrasound guidance into the liver or pancreas. We envision a maximum of 4 new techniques for 5 trainees. 4 live animals per procedure will also be required here. = 4*5*4= 60 mice.</p> <p>Total number of mice is= 4090</p>	
Gender	We strive to use both genders in order to exclude any potential sex-specific effects (in some cases gender may be important, e.g. in case of breast cancer).	
Genetic alterations	Immunocompromised mice will be employed when human cancer cells are engrafted.	
Strain	C57BL/6 and BALB/c mice are required for regularly used mouse cancer cell lines. The strain used depends on the origin of the mouse cancer. E.g, 4T1 murine breast cancer cells originate from a C57BL/6 mouse, and CT26 CRC cells originate from a BALB/c mouse. NU/J and NOD/SCID mice are mice that have varying degree of immunological deficiency, and are therefore required for the engraftment of human cancer cells. Which strain is used depends on literature. This information is known for established cell lines. For patient-derived cells, NOD/SCID mice are always used.	

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

Click or tap here to enter text.

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.

Cancer progression will cause pain in late stages (reached only in overall survival experiments). We monitor the animals closely in accordance to standardized welfare scoring lists to prevent this. We do not use pain relieving methods since these may interfere with the treatment.

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

Mice will be anesthetized during imaging, cancer cell engraftment, and primary tumor resection. The animals receive carprofen 30 min before surgery and the day after for pain relief. In addition, Lidocaine and Bupivacaine

are injected s.c. at the site of incision before the start of the procedure. All procedures will be conducted in accordance with standardized protocols, and the animals will be monitored meticulously throughout the procedure and for a period of time afterwards (depending on the severity of the operation).

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

- Stress during the procedures.
- Consequences of surgery and narcosis: e.g. lethargy, abnormal gait, lack of grooming, weakness. The mice should recover within 2 days after surgery.
- Consequences of narcosis required for imaging: e.g. lethargy, abnormal gait, lack of grooming, weakness. The mice should recover within 1 day after imaging.
- Consequences of cancer progression: e.g., severe loss of weight, labored breathing, a hunched posture, self-mutilation, severe loss of activity, cold extremities, ascites.
- (Chemo) therapy-induced toxicity could occur. Signs include lethargy, lack of grooming, loss of activity and tremors.

Explain why these effects may emerge.

- Complex surgical procedures, such as those requiring a laparotomy, may result in complications including bowel movement obstruction, wound reopening, hypothermia, and dehydration.
- Anaesthetics will result in a state of drowsiness after the procedure, which may have a more pronounced effect on some animals than on others.
- Cancer progression can reduce organ function and other complications, such as breathing problems or obstruction of the intestinal tract.
- This is the first instance in which certain chemotherapeutic regimens will be tested *in vivo* by us. It is therefore possible that unforeseen side effects may occur.

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

- Stress during procedures cannot be avoided, but mice will be handled by experienced and well-trained researchers.
- All procedures will be conducted by well-trained researchers and in accordance with standardized protocols. After surgery, the mice are placed on heating mats and monitored for at least 30 min until they are fully awake and active. The day after surgery, the animals are checked again. This is repeated when mice show signs of discomfort.
- After imaging, the mice are monitored for at least 10 minutes until fully awake and active.
- Cancer progression and concurrent symptoms are monitored using a standardized welfare scoring list. Symptoms can be scored on this list, resulting in a total discomfort score per mouse. The total score determines whether an animal is examined twice weekly, daily, twice daily, or when a humane endpoint is reached and the mouse is sacrificed.
- Adverse effects of therapeutic interventions are minimized by employing the optimal dose and treatment schedule determined in previous experiments. Chemotherapy regimens will be based on literature or knowledge from collaborators.

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.

All clinical symptoms are all assessed and scored according to a standardized welfare scoring list (see 2A, procedures). The scoring list rates the clinical signs and their severity, resulting in an overall health score for each mouse. The resulting total score will decide whether a HEP is applied. The welfare scoring list is closely evaluated prior to the start of the experiment to determine if it meets the OBSERVE guidelines for the model and cancer indication[1].

For all models the HEP is reached when:

- Loss of more than 15% of body weight within 2 days or 20% in total.
- Visible weight loss when overall body weight remains stable: visible ribs and spinal cord.
- Mice show signs of excessive tumor growth:
- Severe loss of activity, labored breathing, cold/blue extremities, ruffled fur, a hunched posture, increased circumference of the abdomen (as a sign of ascites), closed eyes, self-mutilation, loss of ability to eat or drink.

For primary tumors: the HEP is reached when the tumor reaches a size 1000 mm³

Treatment may cause acute and long-term toxicity:

- Acute symptoms include loss of activity, isolation, and tremors. When these signs are not resolved within 2 hours a HEP is reached.
- Long term symptoms include weight loss, lethargy, ruffled fur, hunched posture, and labored breathing.

Indicate the likely incidence.

In experiments where the overall survival is determined, mice will be sacrificed when humane endpoints are reached. This will be approximately 50% of all experiments. In experiments where mice are sacrificed at a predetermined time point, the likely incidence that humane endpoints are reached are low, since the goal of these experiments is to assess treatment outcome at an earlier time point. However, unforeseen complications may arise, which we predict will be in max 10%.

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).

- Injections, imaging and blood withdrawal: mild
- S.c. engraftment of breast cancer cells or in the mammary fat pad: mild
- Engraftment requiring a laparotomy (e.g. in the caecum, or ovarian bursa): moderate
- Primary tumor resection (for breast cancer tumors): moderate
- Consequences of cancer progression: mild for primary tumor growth, moderate when metastases have formed.
- In overall survival experiments, it can be more difficult to assess discomfort, and in rare cases mice may spontaneously succumb to the disease (even with intensive welfare scoring), which is then scored as "severe". We strive to prevent this, but it remains a possibility. As such, we have included 4% "severe".
- Unexpected (chemo) therapy-induced toxicity: moderate
- The discomfort, duration and frequency per procedure are included in the table on page 7. The frequency of procedures is chosen so that the discomfort score does not change.

Cumulative discomfort per type of experiment:

- S.c. implantation of cancer cells to form a primary tumor (20% of all experiments): mild.
- Orthotopic implantation of cancer cells where the mice are sacrificed at a predetermined timepoint (40%): Mild in 50%, moderate in 50% (20% and 20% of total).
- Orthotopic implantation of cancer cells where overall survival is the primary outcome parameter (40%): Moderate in 90%, severe in 10% (36% and 4% of total).

Mild: 1636 mice = 40%

Moderate: 2290 mice = 56%

Severe: 164 mice = 4%

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	Novel compounds are tested first in cancer cell lines and 3D cancer organoids. Only compounds that have shown anti-cancer effect <i>in vitro</i> will only be tested in mice. Furthermore, we will only engraft cell lines in mice that show sensitivity to our compounds <i>in vitro</i> . Systemic treatment effects and side effects can only be studied properly in living organisms that have a similar physiology compared to humans and therefore the mice cannot completely be replaced.
Reduction	<ul style="list-style-type: none"> - The number of animals used in full scale experiments is reduced by the selection of reliable models that show limited variation. This is achieved by performing pilot experiments first. - Prior to conducting further experiments, it is essential to ascertain the potential of our compounds in a novel indication. This will be accomplished through the execution of a single experiment, which will subsequently inform the decision regarding whether to pursue testing of additional readouts or cell lines. - Tumor size and metastasis formation will be determined longitudinally (e.g., through bioluminescence imaging or calliper measurements), decreasing the number of independent groups that need to be compared. Thus, both the number of mice and variability within an experiment is reduced.
Refinement	<ul style="list-style-type: none"> • Appropriate anesthesia and analgesia are applied during procedures. • These mice are housed in IVC cages to reduce infections. • Survival is rated as time till euthanasia (based on HEP criteria) and not time till spontaneous death. • We have established elaborate and standardized welfare scoring lists to assess cancer progression and discomfort during the experiments and to reduce the incidence of spontaneous death occurring in cooperation with the care taking staff. Although this list has been refined already over the last 5 years, we aim to improve it even further according to the OBSERVE guidelines[1], to reduce severe discomfort as much as possible. • We have included extra animals to refine the procedure for orthotopic implantation of cancer cells. The goal is to reduce the need for laparotomy by transplanting cells into the liver or pancreas under ultrasound guidance.

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.

Click or tap here to enter text.

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.

Click or tap here to enter text.

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.

N/A

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.

Click or tap here to enter text.

3. 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.

Click or tap here to enter text.

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

The mice have developed cancer and we will analyze their organs for morphology, the presence of metastases, and biomarker expression.

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.

Click or tap here to enter text.

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

No > Describe the method of killing.

Cervical dislocation

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

Click or tap here to enter text.

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

Click or tap here to enter text.

1. De Vleeschauwer, S.I., et al., *OBSERVE: guidelines for the refinement of rodent cancer models*. Nat Protoc, 2024. **19**(9): p. 2571-2596.
2. Camara Serrano, J.A., *Ultrasound Guided Surgery as a Refinement Tool in Oncology Research*. Animals (Basel), 2022. **12**(23).
3. Workman, P., et al., *Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research*. Br J Cancer, 2010. **102**(11): p. 1555-77.
4. Fentener van Vlissingen, J.M., et al., *The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report*. Lab Anim, 2015. **49**(4): p. 267-83.
5. Diehl, K.H., et al., *A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes*. J Appl Toxicol, 2001. **21**(1): p. 15-23.
6. Julovi, S.M., J.L. Martin, and R.C. Baxter, *Nuclear Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 As a Biomarker in Triple-Negative Breast Cancer Xenograft Tumors: Effect of Targeted Therapy and Comparison With Chemotherapy*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 120.
7. Song, K.J., et al., *Lectin from Sambucus sieboldiana abrogates the anoikis resistance of colon cancer cells conferred by N-acetylglucosaminyltransferase V during hematogenous metastasis*. Oncotarget, 2017. **8**(26): p. 42238-42251.
8. Jiang, Y., et al., *NAD(+) supplementation limits triple-negative breast cancer metastasis via SIRT1-P66Shc signaling*. Oncogene, 2023. **42**(11): p. 808-824.

9. Wang, J., et al., *Orthotopic and Heterotopic Murine Models of Pancreatic Cancer Exhibit Different Immunological Microenvironments and Different Responses to Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 863346.
10. Higuchi, T., et al., *Investigation into metastatic processes and the therapeutic effects of gemcitabine on human pancreatic cancer using an orthotopic SUIT-2 pancreatic cancer mouse model*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(3): p. 3091-3099.



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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	2	Analysis of the efficacy of novel compounds in cancer, starting from genetically engineered modified mice (GEMMs)

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.

This appendix describes the assessment of novel compounds in genetically engineered mouse models (GEMMs) for cancer. We aim to assess the efficacy of our lead compound [REDACTED] as well as maximum of two novel compounds in two GEMMs. The GEMMs that we will use are an existing model for colorectal cancer (CRC) and a model for high-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC). These models model tumor growth and metastasis formation in an endogenous tissue context, allowing the study of how immune cells, stroma and other factors in the tumor microenvironment contribute to disease progression and treatment response. The primary outcome parameters for these experiments are tumor growth, metastasis formation and the progression-free and overall survival.

The CRC model contains an APC knockout and oncogenic Kras^{G12D} allele, combined with a tamoxifen inducible Cre recombinase with Cre expression in the distal intestinal tract [1]. The mice develop CRC tumors a month after tamoxifen induction.

The HGSOC model harbors a p53 R172H mutation and a Dicer1-Pten double-knockout [2]. In these mice, high-grade serous carcinomas arise from the fallopian tube between 1–2 months, which metastasizes throughout the pelvic and abdominal cavities.

As described in the project proposal, the entire project consists of four phases. In the context of this appendix, these phases include:

- **Phase 1:** novel compounds are evaluated *in vitro*
- **Phase 2:** assess whether primary tumor growth and metastasis formation occur as expected.
- **Phase 3:** the efficacy of novel compounds is determined in these GEMMS
- **Phase 4:** the novel compounds are tested in patients

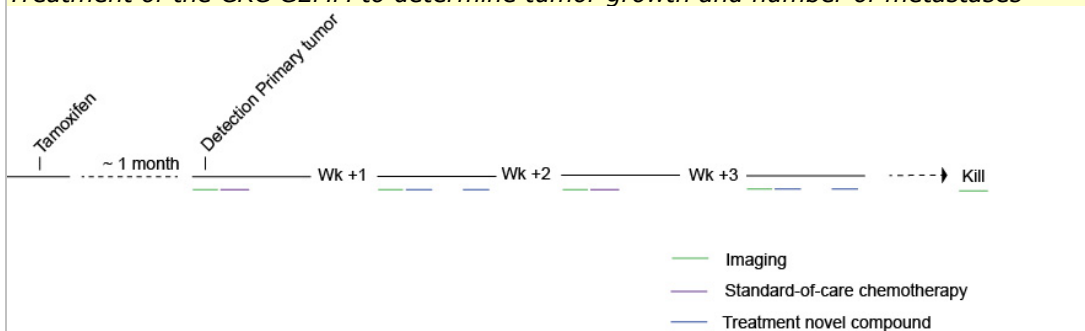
We will combine the novel compounds with standard-of-care chemotherapy, to study their effect on chemotherapy resistance. The therapy and regimen used will depend on the compound (as determined in *in vitro* experiments), but for CRC we will most likely treat with 5-fluorouracil, and the HGSOC model will likely be treated with Paclitaxel, Cisplatin or Olaparib[3].

A general experimental setup is as follows:

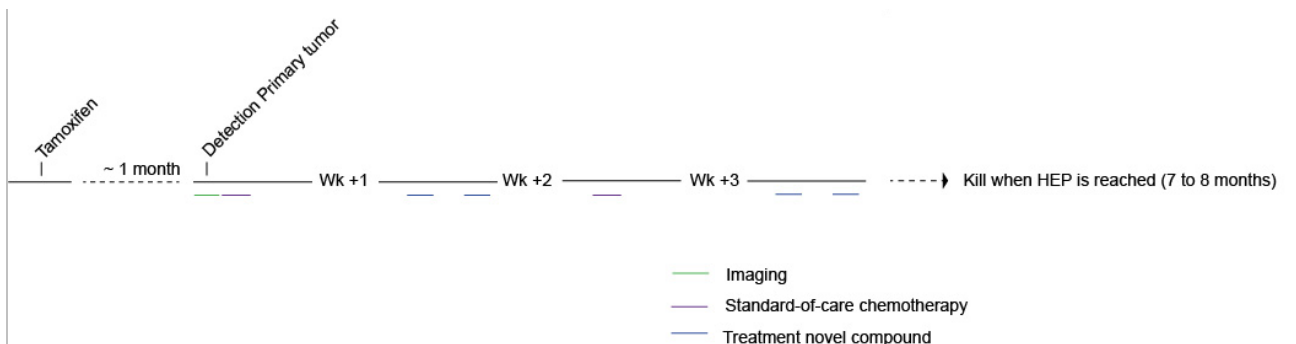
- 1) The mice will be weighed and receive ear marks at 6 to 12 weeks.
- 2) The CRC mice will receive Tamoxifen treatment to induce the oncogenic KRAS signaling and the knockout of APC.
- 3) Cancer progression will be measured by CT, positron emission tomography (PET), and single Photon Emission Computed Tomography (SPECT). A radioactively labeled tracer (^{18}F -FDG) will be injected. Imaging will be conducted max once a week.
- 4) When a primary tumor is detected in all mice, the mice will be randomized based on the standardized uptake value (SUV). The SUV in PET imaging is a quantitative measure that reflects the concentration of radiotracer uptake in a region of interest, normalized for the injected dose and body weight.
- 5) Treat with:
 - a. Control (PBS or NaCl)
 - b. A novel compound
 - c. Appropriate standard-of-care chemotherapy
 - d. Chemotherapy followed by, or in parallel with a novel compound. Treatment strategies may include multiple treatment rounds.
- 6) Cancer progression is monitored as in (3) during and after the treatment period.
- 7) Blood, feces, and urine may be sampled before treatment, after an initial chemotherapy round and after treatment with the novel compound. Organ function, circulating tumor DNA and compound concentrations can be measured in these samples.
- 8) We will assess health parameters twice a week to determine cancer progression and resulting discomfort. This will be done according to a standardized welfare scoring list. This list will guide the decision to increase the observation frequency or when a HEP is reached.
- 9) The mice will be sacrificed either when their HEP is reached for overall survival experiments or at a predetermined timepoint when primary outcome parameters such as the number of metastases is of interest. In all experiments, tissue samples are obtained to study organ morphology, apoptosis, and the presence of biomarkers for compound sensitivity.

Examples of typical experiments:

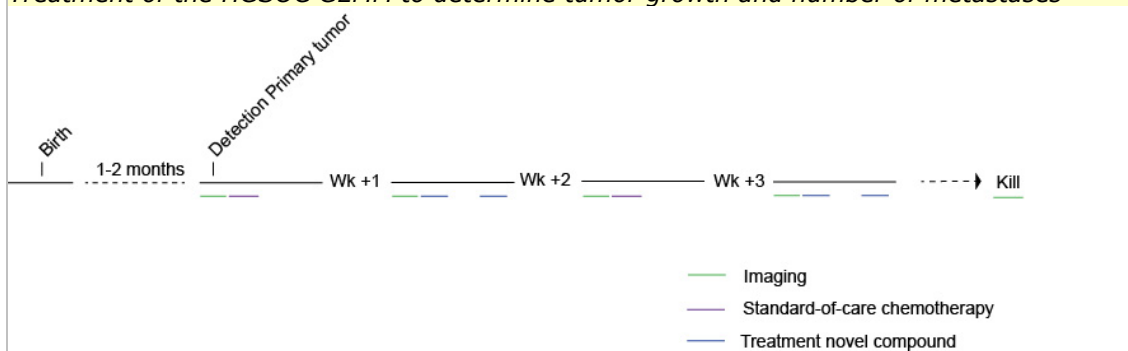
Treatment of the CRC GEMM to determine tumor growth and number of metastases



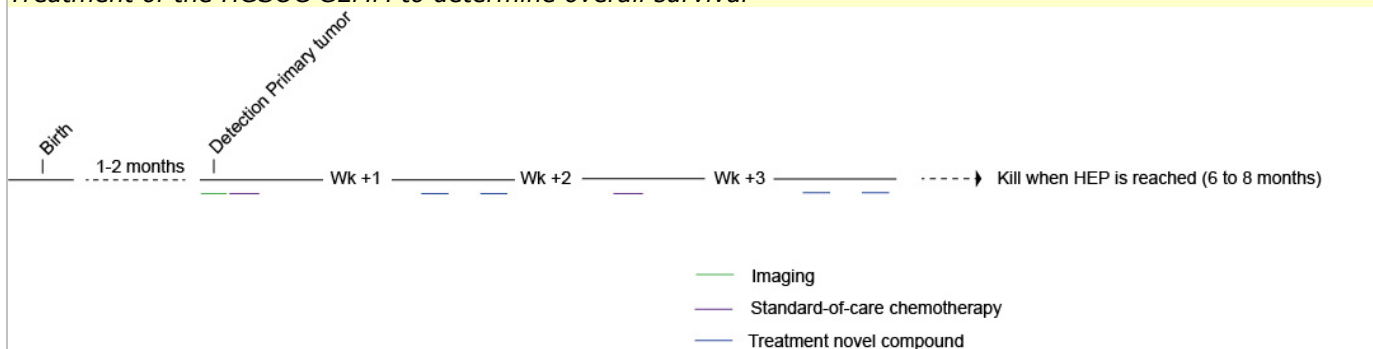
Treatment of the CRC GEMM to determine overall survival



Treatment of the HGSOC GEMM to determine tumor growth and number of metastases



Treatment of the HGSOC GEMM to determine overall survival



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

Cancer induction

Six- to 12-week-old APCf/f KRAS+/f CDX2-Cre-ERT2 mice are given 80 mg/kg tamoxifen in sweetened milk by pipette administration once every 24 hours for 5 consecutive days while gently restrained (held by the scruff).

Imaging

Glucose analog fluorodeoxyglucose (FDG) labeled with the radioactive isotope fluorine-18 (^{18}F), is injected 1 hour prior to PET imaging. ^{18}F -FDG accumulates in tissues with high glucose metabolism, such as cancer cells. The mice are imaged after 8–12 h of fasting to reduce blood glucose levels and minimize competition between glucose and FDG for uptake by tissues, enhancing the contrast between normal and abnormal metabolic activity. The mice will be anesthetized during imaging using isoflurane and the temperature will be controlled using heating mats and lamps to keep the body temperature of the mice between 36.5 and 38C. The imager also contains a heated imaging surface to maintain the body temperature. The temperature of the mice can be monitored using an infrared thermometer. To avoid undue stress on the animals, imaging is performed no more than once a week.

Treatments

- Therapeutic treatment is started in both GEMMs when a primary tumor is detected by imaging. Chemotherapy and our novel compounds will be administered via subcutaneous injection, intravenous injection, intraperitoneal injection, or via oral gavage max volumes according to Diehl et al [4]).
- Our lead compound [REDACTED] will be administered twice per week, on a biweekly basis. This is based on previous experiments in which the optimal dose and frequency were determined. Similarly, novel compounds will also be administered twice per week, unless there is *in vitro* evidence to suggest otherwise.

CRC tumors will be treated with 5-FluoroUracil once every two weeks, while HGSOC will most likely be treated with a combination of Paclitaxel, Cisplatin, or Olaparib every two weeks. Cytotoxic chemotherapy, such as Paclitaxel and Cisplatin, often cause toxicity in mice with commonly used treatment schedules[5]. We will therefore use a dose that is 10 times lower than the maximum tolerated dose for these.[6]

Assessment health parameters

The mice are weighed, and health parameters monitored twice a week and scored according to our standardized welfare scoring list. This list was made in accordance with FELASA guidelines [7] and refined based on our own experience. The scoring list rates the clinical signs and their severity, resulting in an overall health score for each mouse. This health score determines whether the observation frequency needs to be increased or whether a humane endpoint is reached. When, according to the scoring list HEP is reached, the mouse is euthanized, and organs are harvested.

Examples of symptoms that are scored are:

- Loss of more than 15% of body weight within 2 days or 20% in total. Alternatively, visible weight loss when overall body weight remains stable: visible ribs and spinal cord.
- Standard uptake value (SUV) > 2.5 as determined by PET/CT scan.
- Signs of excessive tumor growth: severe loss of activity, labored breathing, cold/blue extremities, ruffled fur, a hunched posture, rectal bleeding, increased circumference of the abdomen (as a sign of ascites), closed eyes, self-mutilation, loss of ability to eat or drink.

An example of a Welfare checklist is as follows. Note that this is a live document that can be periodically updated:

STEP 1

PROCEDURES LIST – INDIVIDUAL ANIMAL (TABLE 5)
B WORK PROTOCOL

Clinical signs	Severity			
	0	0.1	0.4	4
Coat	Smooth	Patches of hair pilo-erected	Majority of back is ruffled	Ruffled Fur
Anaemia & Hypothermia	Optimal	Slight, not quantifiable by eye	Pale mucous membranes	Cold, pale or blue extremities
Eyes	Open	Not fully open, possibly with secretions	Eyes half closed Possibly with secretions	Eyes closed or milky
Weight	Optimum Hip bones, ribs and spinous processes are palpable with gentle pressure but not generally visible	Lean Overlying muscles give the hips a more firm feel	Thin Minimal fat reserves Spinous processes are easily palpable	Emaciated Very prominent, easily palpable and likely visible spinous processes and ribs, little of no flesh covers dorsal pelvis
Level of activity	Normal amount Mouse eats, drinks, climbs, runs	Active but avoids standing upright: Hunched Posture	Mouse moves when provoked; difficulty getting food or water	Mouse is stationary when provoked; uses cage for support
Respiration quality	Optimal	Brief moments of labored breathing	Labored no gasping	Labored with intermittent gasps
Respiration rate	Normal, rapid	Rare, not quantifiable by eye	Severely reduced respiration	Extremely reduced >1 s between breaths
Tumor size	Slight, not quantifiable by eye	Small tumors next to the hind leg	Large tumor Open wound but healing	Large tumor that interferes with locomotion with an open wound the mouse scratches constantly
Tumor burden	None	Slight, not quantifiable by eye	Enlarged lymph nodes or spleen	Bloodstained discharge from any orifice
Total score 1:				

STEP 2

Additional scoring related to the tumor burden

4	4	0
Failure to eat or drink over a 48h period	Incontinence or diarrhea over a 48h period	None of the two observations

Total score 2:

STEP 3

The individual mouse score = 10 - Total score1 - Total Score 2

Score	10	10 - 8	5-7	0-4	0
Health	Optimal	Decreased	Bad	Very bad	Terminal disease
Observation frequency	Usual	Usual	Every day	Twice/day	HEP is reached
Action		Place food inside cage	Weigh mouse Go to Step 4 then recalculate score	Weigh mouse Go to step 4 then recalculate score	Contact Researcher

STEP 4

Weight loss chart

1	-1	HEP	HEP
Normal	<10%	15% maintained for 72h	20% rapid or consistent from the start

Collection of urine, feces, and peripheral blood.

Urine, feces, and peripheral blood will be collected at the beginning of an experiment, an intermediate point (e.g. before start of treatment), and before sacrifice. Blood will be collected from an appropriate site with a max volume 100ul. Urine and feces will be collected by placing the mouse on parafilm. At least 50ul Urine and one solid piece of feces will be collected. This is done within reason and should not lead to moderate discomfort. Repeat after 24hrs if unsuccessful.

Maximum frequency and discomfort of procedure per type of experiment

	Discomfort per occasion	Duration of discomfort	Frequency	Cumulative discomfort
Sacrifice at a predetermined timepoint				Moderate
Tamoxifen treatment	Mild	10 min	Every 24 hours for 5 consecutive days	Mild
Imaging	Mild	1 hr	max once/week	Moderate
Assessment health parameters	-	-	Standard twice a week, max twice a day based on overall health score	-
Collection of urine, feces, and blood	Mild	10 min	3 times over the whole experiment (max once a week)	Mild
Therapeutic intervention	Mild	5 min	Depends on the treatment, max once a day	Mild
Overall survival				Moderate or severe (in case of accidental death)
Tamoxifen treatment	Mild	10 min	Every 24 hours for 5 consecutive days	Mild
Imaging	Mild	1 hr	max once/week	Moderate
Assessment health parameters	-	-	Standard twice a week, max twice a day based on overall health score	-
Collection of urine, feces, and blood	Mild	10 min	3 times over the whole experiment (max once a week)	Mild

Therapeutic intervention	Mild	5 min	Depends on the treatment, max once a day	Mild
--------------------------	------	-------	--	------

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

The number of animals will be minimized by:

- Testing novel compounds extensively *in vitro*. Compounds will only be tested in mice when they show sufficient potency against cancer cell vs normal cells (Go-/no-go point 1).
- Performance of a statistical power analysis to determine the mice needed for experiments. Here, we will use the Sigma and Delta based on literature and on the pilot experiment. We will consult a statistician if necessary.
- Longitudinal imaging will be performed, so fewer separate cohorts are needed.
- When possible: testing of multiple novel compounds in parallel, since this reduces the amount of control groups necessary

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	Mus Musculus	Commercial breeder (Jax)	6-52 weeks	248	Male and Female	Yes	APCf/f KRAS+/f CDX2-Cre-ERT2
1	Mus Musculus	collaborator	6-52 weeks	496	Female	Yes	p53LSL-R172H/+ Dicerflox/flox Ptenflox/flox Amhr2cre/+

Provide justifications for these choices

Species	Mice are employed in this study since most genetically engineered models of cancer are developed in this species. Moreover, they are straightforward to care for, image, and accommodate larger group sizes.
Origin	The CRC mice (APCf/f KRAS+/f CDX2-Cre-ERT2) are obtained from a commercial breeder, since they are available at JAX. The HGSOc mice (p53LSL-R172H/+ Dicerflox/flox Ptenflox/flox Amhr2cre/+) are obtained from a collaborator, since they are not commercially available.
Life stages	An experiment will start at 6 weeks. According to literature, the maximum survival of these two models is about 10 months. If the treatment proves successful, we expect a maximum of 12 months overall survival.
Number	<p>Because we make use of go-/no-go moments, we will only proceed with compounds that are promising and which pass the <i>in vitro</i> stages in go-/no-go moment 1 (phase 1 of the project). When entering the <i>in vivo</i> part of this project, we thus envision the following numbers:</p> <p><u>Phase 2 (until go-/no-go moment 2): max 24.</u> In this phase we will evaluate whether the two GEMMs indeed develop tumors and metastases as described in literature. We will sacrifice the animals at two timepoints to assess primary tumor growth and metastasis formation. For the CRC model, four mice per timepoint will be used, as this provides a reliable indication for a pilot study, in our experience. Due to greater variability in the HGSOc model, eight mice per timepoint will be used for that group [2]. = 24.</p> <p><u>Phase 3 (until go-/no-go moment 2): max 120.</u> Based on the pilot experiments we will calculate group sizes needed to reach significant conclusions. We will use GPower software to calculate group sizes, using a one-tailed t-test</p>

when comparing 2 groups and an ANOVA for multiple groups. When comparing multiple groups, we will apply a Bonferroni correction. For overall survival experiments, we will apply a log-rank test to analyse results. The primary outcome parameter of interest and the variation observed in the pilot experiment will determine the input values for the group size calculation.

As an example, the paper describing the HGSOC model reports a median survival of 6.6 months with a standard deviation of 1.55 [2]. To detect a 20% increase in survival, we have calculated a group size of 18 mice per group. To account for potential unexpected attrition, we will increase the group size by 10%, bringing the total to 20 animals per group. 20 mice per group is higher than the cutoff applied in appendix 1 (max 14 mice/group), but there is no GEMM model available to us with less variation. Our own pilot will determine whether the group size is ultimately smaller or larger. If larger group sizes are required, we will not proceed with the model.

The paper outlining the development of the CRC GEMM does not provide enough data to accurately input into GPower. However, they achieved significant results with group sizes of 8 or 9 mice. To account for potential unexpected attrition, we anticipate using groups of 10 mice. Our pilot study will generate the necessary input values for more accurate calculations. If the results from these calculations indicate that larger group sizes are needed, we will discontinue the use of this model.

~~Based on literature, we anticipate this to be approximately 10 per group for the CRC GEMM, and 20 for the HGSOC group.~~

We will first evaluate the effect of [REDACTED] on overall survival in these two models. To this end, four experimental groups will be tested: a control group, a [REDACTED] treated group, a chemotherapy-treated group, and a group treated with a combination of chemotherapy and [REDACTED]. For the CRC GEMM, these results in 40 mice, and for the HGSOC GEMM in 80 mice.

Phase 3b (until go-/no-go moment 3): max 600

When the initial experiments are successful, an experiment will be performed to assess metastasis formation after [REDACTED] treatment at a predetermined timepoint. = max 120 mice in total for the two GEMMs.

Furthermore, more compounds can be tested (max 2) in these models. Two readouts per compound can be assessed in two distinct experiments (overall survival and number of metastases). This results in 120*4=480 mice.

Phase	GEMM	Mice per group	Read-outs	Experimental groups	Compounds	Max # mice
2	CRC	4	2	1	-	8
2	HGSOC	8	2	1	-	16
3a	CRC [REDACTED]	10	1	4	1	40
3a	HGSOC [REDACTED]	20	1	4	1	80
3b	CRC [REDACTED]	10	1	4	1	40
3b	HGSOC [REDACTED]	20	1	4	1	80
3b	CRC new compounds	10	2	4	2	160
3b	HGSOC new compounds	20	2	4	2	320

Total number of mice: 744

Gender For the CRC model, we strive to use both genders to exclude any potential sex-specific effects. In ovarian carcinoma, we will use only female mice.

Genetic alterations We aim to study spontaneous cancer formation and progression. This is achieved by employing models with activating oncogene mutations and/or deletions of tumor suppressive genes in relevant locations.

	For CRC, loss of tumor suppressor APC is a driver mutation in 72% of patients in The Netherlands [8], and 17% has both an APC mutation and an activating KRAS mutation [9]. In HGSOc, p53 is mutated in almost all patients [10]. Dicer1 and PTEN deletion proved to give rise to high-grade serous carcinomas in the fallopian tube in mice, making the model ovarian carcinoma specific [2].
Strain	These strains harbour the relevant mutations for either CRC or HGSOc and have already been optimized by other researchers.

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

Click or tap here to enter text.

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.

Cancer progression will cause pain in late stages (reached only in overall survival experiments). We monitor the animals closely in accordance to standardized welfare scoring lists to prevent this. We do not use pain relieving methods since these may interfere with the treatment.

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

Mice will be anesthetized during imaging.

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

- Stress during the procedures.
- Consequences of narcosis required for imaging: e.g. lethargy, abnormal gait, lack of grooming, weakness. The mice should recover within 1 day after imaging.
- Consequences of cancer progression: e.g., severe loss of weight, labored breathing, a hunched posture, self-mutilation, severe loss of activity, cold extremities, ascites, rectal bleeding.
- (Chemo) therapy-induced toxicity could occur. Signs include lethargy, lack of grooming, loss of activity and tremors.

Explain why these effects may emerge.

- Anaesthetics will result in a state of drowsiness after the procedure, which may have a more pronounced effect on some animals than on others.
- Cancer progression can reduce organ function and other complications, such as breathing problems or obstruction of the intestinal tract.
- This is the first instance in which certain chemotherapeutic regimens will be tested *in vivo* by us. It is therefore possible that unforeseen side effects may occur.

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

- Stress during procedures cannot be avoided, but mice will be handled by experienced and well-trained researchers.
- All procedures will be conducted by well-trained researchers and in accordance with standardized protocols.
- After imaging, the mice are monitored for at least 10 minutes until fully awake and active.

- Cancer progression and concurrent symptoms are monitored using a standardized welfare scoring list. Symptoms can be scored on this list, resulting in a total discomfort score per mouse. The total score determines whether an animal is examined twice weekly, daily, twice daily, or when a humane endpoint is reached and the mouse is sacrificed.
- Adverse effects of therapeutic interventions are minimized by employing the optimal dose and treatment schedule determined in previous experiments. Chemotherapy regimens will be based on literature or knowledge from collaborators.

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.

All clinical symptoms are all assessed and scored according to a standardized welfare scoring list (see 2A, procedures). The scoring list rates the clinical signs and their severity, resulting in an overall health score for each mouse. The resulting total score will decide whether a HEP is applied. The welfare scoring list meets the OBSERVE guidelines for the model and cancer indication [11].

For all models the HEP is reached when:

- Loss of more than 15% of body weight within 2 days or 20% in total.
- Visible weight loss when overall body weight remains stable: visible ribs and spinal cord.
- Mice show signs of excessive tumor growth:
- Severe loss of activity, labored breathing, cold/blue extremities, ruffled fur, a hunched posture, increased circumference of the abdomen (as a sign of ascites), rectal bleeding, closed eyes, self-mutilation, loss of ability to eat or drink.

Treatment may cause acute and long-term toxicity:

- Acute symptoms include loss of activity, isolation, and tremors. When these signs are not resolved within 2 hours a HEP is reached.
- Long term symptoms include weight loss, lethargy, ruffled fur, hunched posture, and labored breathing.

Indicate the likely incidence.

In experiments where the overall survival is determined, mice will be sacrificed when humane endpoints are reached. This will be approximately 50% of all experiments. In experiments where mice are sacrificed at a predetermined time point, the likely incidence that humane endpoints are reached are low, since the goal of these experiments is to assess treatment outcome at an earlier time point.

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).

- Consequences of cancer progression: mild for primary tumor growth, moderate when metastases have formed.
- In overall survival experiments, it can be more difficult to assess discomfort, and in rare cases mice may spontaneously succumb to the disease (even with intensive welfare scoring), which is then scored as "severe". We strive to prevent this, but it remains a possibility. As such, we have included 5% "severe".
- Unexpected (chemo) therapy-induced toxicity: moderate

Cumulative discomfort per type of experiment:

- Experiments where the mice are sacrificed at a predetermined timepoint (50%): moderate
- Experiments where overall survival is the primary outcome parameter (50%): moderate in 90%, severe in 10% (45% and 5% of total).

Moderate: 707 mice= 95%

Severe: 37 mice= 5%

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	Novel compounds are tested first in cancer cell lines and 3D cancer organoids. Only compounds that have shown anti-cancer effect <i>in vitro</i> will be tested in mice. Systemic treatment effects and side effects can only be studied properly in living organisms that have a similar physiology compared to humans and therefore the mice cannot completely be replaced.
Reduction	<ul style="list-style-type: none">- Tumor size and metastasis formation will be determined longitudinally (through imaging), decreasing the number of independent groups that need to be compared. Thus, both the number of mice and variability within an experiment is reduced.- When possible: testing of multiple novel compounds in parallel, since this reduces the number of control groups necessary.
Refinement	<ul style="list-style-type: none">• Appropriate anesthesia is applied during procedures.• These mice are housed in IVC cages to reduce infections.• Survival is rated as time till euthanasia (based on HEP criteria) and not time till spontaneous death.• We have established elaborate and standardized welfare scoring lists to assess cancer progression and discomfort during the experiments and to reduce the incidence of spontaneous death occurring in cooperation with the care taking staff. Although this list has been refined already over the last 5 years, we aim to improve it even further according to the OBSERVE guidelines[11], to reduce severe discomfort as much as possible.

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.

Click or tap here to enter text.

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.

Click or tap here to enter text.

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.

N/A

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.

Click or tap here to enter text.

3. 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.

Click or tap here to enter text.

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

The mice have developed cancer and we will analyze their organs for morphology, the presence of metastases, and biomarker expression.

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.

Click or tap here to enter text.

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

No > Describe the method of killing.

Cervical dislocation

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

Click or tap here to enter text.

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

Click or tap here to enter text.

1. Maitra, R., et al., *Development and Characterization of a Genetic Mouse Model of KRAS Mutated Colorectal Cancer*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(22).
2. Kim, O., et al., *In vivo modeling of metastatic human high-grade serous ovarian cancer in mice*. PLoS Genet, 2020. **16**(6): p. e1008808.
3. Gao, J., et al., *Combination treatment with cisplatin, paclitaxel and olaparib has synergistic and dose reduction potential in ovarian cancer cells*. Exp Ther Med, 2021. **22**(3): p. 935.
4. Diehl, K.H., et al., *A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes*. J Appl Toxicol, 2001. **21**(1): p. 15-23.
5. Perse, M., *Cisplatin Mouse Models: Treatment, Toxicity and Translatability*. Biomedicines, 2021. **9**(10).
6. Aston, W.J., et al., *A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice*. BMC Cancer, 2017. **17**(1): p. 684.
7. Fentener van Vlissingen, J.M., et al., *The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA Working Group Report*. Lab Anim, 2015. **49**(4): p. 267-83.
8. Luchtenborg, M., et al., *APC mutations in sporadic colorectal carcinomas from The Netherlands Cohort Study*. Carcinogenesis, 2004. **25**(7): p. 1219-26.
9. Luchtenborg, M., et al., *Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study*. BMC Cancer, 2005. **5**: p. 160.
10. Tuna, M., et al., *Clinical relevance of TP53 hotspot mutations in high-grade serous ovarian cancers*. Br J Cancer, 2020. **122**(3): p. 405-412.
11. De Vleeschauwer, S.I., et al., *OBSERVE: guidelines for the refinement of rodent cancer models*. Nat Protoc, 2024. **19**(9): p. 2571-2596.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD11500202418434
2. Titel van het project : Targeting aggressive cancer through treatment with compounds against cell scarring, senescence and metastasis
3. Titel van de NTS : Tegengaan van agressieve vormen van kanker met behulp van stoffen tegen littekencellen, senescence en uitzaaiingen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 11-10-2024
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 16-10-2024 en 20-11-2024
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot: 22-10-2024 / 6-11-2024 en 12-11-2024 / 15-11-2024
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 22-11-2024

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 16-10-2024
- Plaats: Online in Teams
- Aantal aanwezige DEC-leden: 7
- Aanwezige (namens) aanvrager: Collega van de verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoeker gehoord over een vraag, die niet meer schriftelijk gesteld zal worden, omdat hij het in vitro werk betreft:

- [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]
- Andere vragen, zoals vermeld bij punt A9a en A9b, zijn ook schriftelijk aan de onderzoekers voorgelegd.
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9a. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 22-10-2024
 - Datum antwoord: 6-11-2024
 - Strekking gestelde vragen en antwoorden:
- De DEC heeft uw NTS en projectaanvraag op 16 oktober 2024 beoordeeld en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen.

Projectvoorstel

3.1 Achtergrond

- Kunt u beschrijven om hoeveel patiënten met 'late-stage metastatic cancer' het gaat, die met deze therapie behandeld zouden kunnen worden aangezien niet elke patiënt hetzelfde is?
Antwoord: Volgens de SEER database zijn er in de V.S. en de 28 EU landen tezamen per jaar 388620 nieuwe patiënten met darmkanker, 134290 met drievoudig-negatief borstkanker en 40386 met hoge-graad eierstokkanker. Het aantal patiënten dat hiervan per jaar uitzaaiingen ontwikkeld is 33.5-62%, waarvan den ongeveer 50% in aanmerking komt voor experimentele behandelingen, omdat de standaardbehandelingen niet aan slaan. Grofweg zijn dit dan zo'n 70.000-90.000 patiënten.

Zoals ook beschreven in de tekst bij 3.1, onder het kopje "Compounds eliminating scarred cells have potential in the treatment of multiple aggressive cancer types", hebben we een substantieel aantal patiëntweefsels (>800) op Tissue MicroArrays (TMA's) gekleurd om biomarkers te identificeren die de gevoeligheid voor onze medicijnen voorspellen. Uit deze analyses blijkt dat, afhankelijk van het type kanker, ongeveer 25 tot 40% van deze patiënten met uitgezaaide kanker mogelijk in aanmerking komt voor behandeling met onze therapieën, tezamen grofweg 25.000 patiënten op jaarbasis, specifiek voor deze drie typen kanker.

N.B. dit is een conservatieve schatting, omdat hierbij alleen gekeken is naar biomarkers die al aanwezig zijn in de primaire tumor. Ná standaardbehandeling met b.v. chemotherapie of radiotherapie is de kans aanzienlijk dat de biomarker-expressie verder toeneemt en meer patiënten in aanmerking komen. Tenslotte gaan we hierbij nu alleen nog uit van deze drie typen kanker, maar het ligt in de lijn der verwachting dan veel meer soorten kanker behandelbaar zullen zijn.

3.3.2 Stakeholders

- Wilt u [REDACTED] (liefst alleen als 'biotech bedrijf' iv, WOO verzoeken) toevoegen als stakeholder? *Antwoord: Gedaan.*

3.4 Strategie

- Bij Phase 4 (p.11 van 14) ontbreekt een stukje tekst. Wilt u dat compleet maken? *Antwoord: Gedaan.*

Bijlage 1

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

- U beschrijft dat u pilot experimenten gaat uitvoeren. Kun u parameters noemen op grond waarvan de pilot experimenten gekarakteriseerd worden als valide of op grond waarvan u de go fase in gaat? Welke veranderingen in uw outcome parameters wilt u zien en in welke mate? Kunt u dat beter toelichten?

Antwoord: Zoals nu uitgebreider is toegelicht in de appendix, zijn er verschillende criteria voor een valide model dat verder gebruikt kan worden:

- *Er zal alleen verder gegaan worden met modellen die minimaal in 50% van de muizen tumorgroei of uitzaaiingen laten zien. Dit om te voorkomen dat er een overmatig aantal dieren niet gebruikt gaat worden in vervollexperimenten.*
- *Een model moet daarnaast een optimale tumorgroei vertonen. Dit betekent concreet dat we niet verder zullen gaan met modellen waarin tumoren of uitzaaiingen zo snel groeien, dat (een deel van) de dieren het humane eindpunt al binnen drie weken na implantatie bereikt. Drie weken is te kort voor een tumor om bijvoorbeeld de benodigde stroma te ontwikkelen dat essentieel is voor biologisch relevante metastasering. Daarnaast is dit een te korte periode voor therapeutische interventie. Een te langzame tumorprogressie geeft daarentegen te veel variatie, weten we uit ervaring. Daarom zullen we niet verder gaan met modellen die een humaan eindpunt pas na 6 maanden bereiken. Samengevat is een progressievenster van drie weken tot zes maanden optimaal. De variatie van de uitkomstparameter van interesse (bijvoorbeeld tumor volume of overleving) mag niet te groot zijn, omdat dan de groepen in een volledig experiment te groot zouden worden. We willen wetenschappelijk relevante data genereren, terwijl we het aantal gebruikte dieren inperken. De benodigde groepsgrootte wordt berekend op basis van de waardes van de uitkomstparameters uit de pilot. Oorspronkelijk hebben we aangegeven dat als deze berekening wijst op meer dan 14 muizen per groep, een model wordt uitgesloten. Echter, we hebben besloten om dit op te splitsen per uitkomstparameter, omdat algehele overleving na implantatie veel meer variatie geeft dan bijvoorbeeld een tumor volume experiment. 14 muizen per groep was gebaseerd op de maximale groepsgrootte die we in het verleden gebruikt hebben. Uit een wat uitgebreidere literatuurstudie blijkt dat er met maximaal 25 dieren per groep significant verschillen gemeten kunnen worden die ook biologisch relevant zijn. Daarom zullen we maximaal 25 dieren gebruiken voor een overlevingsexperiment. Voor studies waarbij tumorvolume of aantal metastases worden gemeten, zullen we daarentegen maximaal 10 muizen per groep gebruiken. Dit is gebaseerd op onze ervaring en op literatuur.*

Procedures

- Kunt u de maximale frequentie aangeven van elke ingreep per type experiment?
Antwoord: Dit staat in de tekst, maar het is nu ook in een tabel gezet om in 1 opslag te kunnen lezen. In deze tabel is ook het ongerief dat bij een ingreep hoort neergezet zoals gevraagd bij punt F.

Statistiek

- De DEC mist een toelichting over hoe u uw data gaat evalueren en een onderbouwing van de groepsgroottes.
- Wat zijn de uitgangswaarden?
- Hoeveel reductie, spreiding of uitval verwacht u?
- Gaat u één- of tweezijdig testen?
- Waarop baseert u de groepsgrootte $n=14$?

Antwoord: De uitgangswaarden zullen afhankelijk zijn van het model dat gebruikt wordt en welke uitkomstparameter van belang is en de spreiding van die betreffende parameter. De belangrijkste uitkomstparameters zullen tumor volume, aantal metastases of overleving zijn. Op basis van uitgevoerde pilotstudies worden, bijvoorbeeld, het gemiddelde aantal metastases of de gemiddelde tumor grootte en de spreiding in deze waarden berekend. Deze waarden worden gebruikt als input voor GPower software om de groepsgroottes te berekenen. Over het algemeen zullen we een eenzijdige t-toets gebruiken voor het vergelijken van 2 groepen en een ANOVA voor meerdere groepen. We gebruiken voornamelijk eenzijdige testen, omdat de hypothese is dat onze medicijnen een positief effect gaan hebben t.o.v. de controle. Bij vergelijking van meerdere groepen passen we een Bonferroni-correctie toe. Voor experimenten met algehele overleving gebruiken we een log-rank toets. Voor de effect grootte die nodig is voor deze berekeningen, gaan we uit van de Go/No-go criteria die we hebben opgesteld in het projectplan (bijvoorbeeld minimaal een 20% afname in metastases).

De precieze uitgangswaarden, spreiding, verwachte uitval en gebruikte statistische test zal uitgebreid worden toegelicht in de afzonderlijke werkprotocollen. En zullen we, zoals we in het verleden gedaan hebben afstemmen met een statisticus.

$N=14$ hebben we eerder vaak gebruikt als de maximale groepsgrootte. Echter, zoals hierboven uitgelegd, zullen we voor overlevingsexperimenten maximaal 25 dieren toestaan en voor overige experimenten 10. Deze aantallen zijn gekozen om het aantal dieren te minimaliseren, terwijl we toch robuuste en betrouwbare data verkrijgen. Dit aantal houdt rekening met een uitvalpercentage van maximaal 10%, of 20% bij complexere procedures zoals een laparotomie.

B. De dieren

- Kunt u onderbouwen bij de statistiek, waarom u voor 12 cellijnen kiest (op blz 8 van 13)?
Antwoord: Eerder hebben we besloten om maximaal 3 cellijnen per kankersoort te testen in pilotexperimenten, om de best groeiende lijn te selecteren voor vervolgentexperimenten. Dit vormt een balans tussen voldoende variatie in cellijnen en het beperken van het aantal muizen dat

gebruikt wordt. In volledige experimenten, waarin we de effectiviteit van onze medicijnen testen, is het niet nodig om 3 cellijnen per kankersoort te gebruiken, omdat dit zou leiden tot onnodig gebruik van muizen. We zullen de meeste experimenten uitvoeren met slechts één cellijn per kankersoort. Echter, voor bepaalde kankersoorten kan er verschil in subtypegevoeligheid zijn voor een compound, gebaseerd op verschillende mutaties of biomarkers. Daarom willen we in sommige gevallen twee cellijnen per kankersoort kunnen gebruiken in de volledige experimenten. Dit is kort verwerkt in de tekst.

- Kunt u het type stammen relateren aan het type cellijn of tumorlijn?

Antwoord: Gedaan in de tekst van de appendix.

F. Classificatie van ongerief

- Kunt u in tabelvorm per ingreep aangeven wat het maximale ongerief is bij een enkele ingreep, de frequentie en de duur van de ingreep en tot slot het maximale ongerief met inachtneming van de frequentie en duur?

Antwoord: Zie het commentaar bij (A). Dit is een tabel verwerkt in de appendix. Het maximale ongerief met inachtneming van frequentie en duur is hetzelfde als het ongerief voor 1x een bepaalde ingreep. Dit omdat we bewust de frequentie kiezen die ervoor zorgt dat het ongerief niet toeneemt.

Bijlage 2

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Statistiek

- De DEC mist een toelichting over hoe u uw data gaat evalueren en een onderbouwing van de groepsgroottes.
- Wat zijn de uitgangswaarden?
- Hoeveel reductie, spreiding of uitval verwacht u?
- Gaat u één- of tweezijdig testen?
- Kunt u onderbouwen waarom u verschillende groepsgroottes verwacht nodig te hebben voor verschillende stammen (n=10 of n=20)?
- Realiseert u zich, dat u dan ook uw pilots op X of op 2xX moet inzetten?
- Waarop baseert u de groepsgrootte n=4?

Antwoord: We zullen GPower-software gebruiken om de groepsgrootte te berekenen, waarbij we eenzijdige t-tests toepassen voor het vergelijken van 2 groepen en een ANOVA voor meerdere groepen. Bij het vergelijken van meerdere groepen passen we een Bonferroni-correctie toe. Voor experimenten met algehele overleving gebruiken we een log-rank toets om de resultaten te analyseren. De primaire uitkomstparameter van belang en de variatie die in de pilotstudie wordt waargenomen, bepalen uiteindelijk de inputwaarden voor de berekening van de groepsgrootte.

Voor het HGSOc model:

het artikel dat het HGSOc-model beschrijft laat een gemiddelde overleving van 6,6 maanden zien, met een standaarddeviatie van 1,55. Om een 20% toename in overleving te detecteren, hebben we een groeps-grootte van 18 muizen per groep berekend. Om rekening te houden met onverwachte uitval, zullen we de groeps-grootte met 10% verhogen, wat het totaal op 20 dieren per groep brengt. 20 muizen per groep ligt hoger dan de grens die is vastgesteld in bijlage 1 (maximaal 14 muizen per groep), maar er is geen GEMM-model beschikbaar met minder variatie. Onze eigen pilot zal bepalen of de uiteindelijke groeps-grootte kleiner of groter zal zijn. Als grotere groeps-groottes nodig blijken bijvoorbeeld door een hoge standaarddeviatie in de primaire uitkomstparameters, zullen we het model niet verder gebruiken.

Voor het CRC model:

Het artikel over de ontwikkeling van het CRC GEMM-model geeft niet genoeg informatie om nauwkeurige invoer in GPower mogelijk te maken. Ze behaalden echter significante resultaten met groeps-groottes van 8 of 9 muizen. Om rekening te houden met onverwachte uitval, verwachten we dus groepen van 10 muizen te gebruiken. Onze pilotstudie zal de nodige inputwaarden genereren voor nauwkeurigere berekeningen. Als uit deze berekeningen blijkt dat grotere groeps-groottes nodig zijn, zullen we stoppen met het gebruik van dit model.

G. Vervanging, vermindering en verfijning

- Wilt u bij verfijning opnemen, dat u de immuun gecompromitteerde muizen in IVC huisvest om de kans op infecties te reduceren?

Antwoord: De dieren zullen inderdaad in IVC gehuisvest worden. Dit is opgenomen in de verfijning voor beide appendices.

Niet Technische Samenvatting

- Wilt u de tekst door een leek laten lezen en de vaktermen vermijden?

Antwoord: De tekst is door een leek gelezen en zij heeft beoordeeld dat de tekst zeer duidelijk te begrijpen is. De vakterm "organoiden" is verwijderd.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9b. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 12-11-2024
- Datum antwoord: 15-11-2024
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

- De DEC heeft uw antwoorden beoordeeld en heeft nog de volgende vragen/opmerkingen. Vriendelijk dank voor de antwoorden op de vragen van de DEC. Er zijn echter nog een aantal onduidelijkheden. Uw antwoorden zullen opnieuw in een DEC vergadering worden beoordeeld op **20 november**:

Bijlage 1

U hebt uw aantallen voor groepsgrootte aangepast in bijlage 1 met de onderbouwing dat u dan nog biologisch relevante resultaten kunt behalen.

- Kunt u dit onderbouwen met referenties?

- Kunt u het verschil tussen statistische relevantie en biologische relevantie uitleggen?

Antwoord: Uit de literatuur blijkt dat met name metastasemodellen (de modellen waarin wij voornamelijk geïnteresseerd zijn) veel variatie vertonen. Hierdoor is het lastig om een therapeutisch effect goed te kunnen beoordelen. Met hogere aantallen dieren kan wel een statistisch significant verschil worden aangetoond in deze variabele modellen. Echter, als hiervoor meer dan 25 dieren nodig zijn, is ofwel de variatie te groot, ofwel het therapeutisch effect te klein om biologisch relevant te zijn. Dit aantal is gebaseerd op meerdere publicaties, waarnaar we nu in de bijlage verwijzen. In deze publicaties zijn modellen beschreven die wij nu al gebruiken en modellen die we in de toekomst eventueel willen gebruiken.

In onze eigen eerdere studies hebben we niet meer dan 14 dieren per groep gebruikt, gebaseerd op een powerberekening op basis van pilotexperimenten. We verwachten ook nu niet vaak tot 25 dieren per groep te komen, maar het is mogelijk dat een nieuw model dit aantal wel vereist. Dit is met name dus een mogelijkheid voor het geval de variatie hoog blijkt te zijn.

Kort samengevat toont statistische relevantie aan dat een effect waarschijnlijk niet door toeval is veroorzaakt, terwijl biologische relevantie aangeeft of het effect daadwerkelijk waardevol of betekenisvol is voor het biologische systeem of de beoogde toepassing.

Bijlage 2

- U hebt het aantal dieren aangepast, maar de aantallen zijn niet met elkaar in overeenstemming (in de tabel 736 dieren en bij de uitleg 744 dieren). Kunt u dit met elkaar in overeenstemming brengen en ook de aantallen in de NTS narekenen?

Antwoord: Ik heb dit nagekeken en de getallen in de tabel komen opgeteld ook tot 744. Ook de getallen in de NTS kloppen.

NTS

- Wilt u de NTS ook in Excel format aanleveren? De CCD neemt alleen het Excel format in behandeling. Dat bespaart u tijd.

Antwoord: In overleg met de IVD en DEC lever ik nu eerst alleen nog de Word versie aan. Het Excel bestand zal wel op tijd ingevuld worden voor de CCD.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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 hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. *De aanvraag beschrijft het onderzoek en ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen soorten kanker die agressief zijn geworden door signalering via senescentie-achtige routes in deze cellen, hetzij door de stromale cellen die ze flankeren. Deze kankercellen hebben de neiging om kankerstemcellen te worden en uit te zaaien. Deze chronisch beschadigde cellen hebben veel kenmerken van cellulaire veroudering 'senescence' en vooral wanneer ze kenmerken van littekens vertonen, hebben onderzoekers bewijs dat ze het doelwit kunnen zijn van [REDACTED], kunnen nieuwe therapieën ontwikkeld worden. Een selectie van kandidaat stoffen gebeurt eerst met in vitro modellen. Er is een heldere strategie opgenomen met een flowchart en besliscriteria voor de volgende stappen. De DEC heeft in twee rondes veel aanvullende vragen gesteld om de aanvraag beter te begrijpen en te beoordelen.*

De aanvraag komt het meest overeen met voorbeeld 1 uit de nieuwe Handreiking "Invulling Definitie Project".

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doel categorieën, te weten fundamenteel onderzoek en translationeel onderzoek, sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is *het onderzoek naar de ontwikkeling van verschillende soorten senescente cellen in muismodellen voor kanker onder verschillende condities (tijdens metastasering of na chemotherapie behandeling en het onderzoeken of bepaalde stoffen dit proces kunnen remmen.*

Het uiteindelijke doel van het project is *het identificeren van nieuwe behandelingen die in de kliniek toegepast zouden kunnen worden en voor welke kankersoorten specifiek.*

De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het onderzoeksveld en de behoeften vanuit oncologen en hun patiënten.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn:

Kankerpatiënten: deze kunnen uiteindelijk baat hebben bij succesvol onderzoek en nieuwe behandelingen.

Proefdieren: worden blootgesteld aan medisch (veterinair) niet noodzakelijke ingrepen en de gevolgen (pijn en stress, de dood).

Wetenschappers: het project zal de kennis over de aanwezigheid en ontwikkeling van senescente cellen in muismodellen voor meerdere indicaties bevorderen en zal bijdragen aan mechanistische inzichten over therapieresistentie en metastasevorming in een systemische setting. Zo kunnen de resultaten van celkweekexperimenten worden gevalideerd in een complexer systeem.

Publieke en private financieringsinstanties: op basis van gevonden resultaten therapieën naar de klinische markt te brengen en de kennis over wetenschappelijke werkingsmechanismen uit te breiden.

Bedrijf: zal uiteindelijk de geselecteerde stoffen verder ontwikkelen en vermarkten met een commercieel belang.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. *De onderzoekers hebben veel ervaring in het onderzoek naar senescente cellen en de beschreven muismodellen. Met behulp van geoptimaliseerde modellen hebben onderzoekers al uitgebreide experimenten uitgevoerd om het behandelingschema, de dosering en de werkzaamheid van de verbindingen te testen, deze gegevens worden nu in alle experimenten toegepast.*

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Onderzoekers hebben op basis van eerder onderzoek een afname van de primaire tumorgroei in twee verschillende TNBC-modellen en een vermindering van het aantal lever- en longmetastasen gezien en de algehele overleving werd verlengd in het geteste model. In het CRC-model verminderden de verbindingen ook het aantal metastasen en waren ze bijzonder effectief in combinatie met chemotherapie. Op basis van aanvullende farmacologie- en veiligheidsstudies die zijn uitgevoerd bij een externe CRO, zijn 2 ontwikkelingskandidaten geselecteerd die beide effectief zijn gebleken tegen agressieve vormen van kanker in een veilige dosis. Deze 4e generatie verbindingen is geselecteerd voor klinische vertaling, [REDACTED] die ook meegenomen zal worden in het project. Onderzoekers hebben alles uitgewerkt in duidelijke flowcharts met beslismomenten (proposal) en in de bijlagen met uitgewerkte experimenten.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. *De handelingen die de dieren moeten ondergaan zijn goed uitgewerkt door frequentie en duur van de handeling op te nemen in een tabel en geclassificeerd per handeling met daarop volgend het cumulatieve ongerief. De IvD heeft hier verder geen andere inschatting op gemaakt, en de DEC heeft ook geen reden dit anders in te schatten.*
12. De integriteit van de dieren wordt *fysiek en gedragsmatig aangetast door het opwekken van tumoren die kunnen uitzaaien, het afnemen van biologisch materiaal tijdens het leven van het dier, de beeldvormende technieken en de uiteindelijke dood om materiaal uit te kunnen nemen voor verder ex-vivo onderzoek.*
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. *Er zijn duidelijke indicatoren opgenomen die resulteren in een score op basis waarvan een HEP moet worden toegepast. HEP kan worden veroorzaakt door snelle tumorgroei, metastasering of toxiciteit van de stof waarmee behandeld zal worden. Hoewel men ernstig ongerief wil voorkomen, zal dat helaas in 4 % van de dieren niet tijdig mogelijk zijn.*

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. *Hoewel in het kankeronderzoek veel gebruik wordt gemaakt van cellijnen voor effectiviteit kan daarmee niet worden vastgesteld wat de mogelijke bijwerkingen zijn. Uitzaaiingen ontstaan onder andere door een interactie van kankercellen met hun omgeving. Hoewel dit in beperkte mate te bestuderen is in celkweken, kan dit doorgaans maar vrij kort en*

ontstaan er dan ook geen echte uitzaaiingen. Muizen zijn daardoor noodzakelijk om te bestuderen hoe uitzaaiingen ontstaan en het beste zijn tegen te gaan. Daarnaast is het noodzakelijk de farmacokinetiek vast te stellen dus in welke organen een nieuwe stof terecht komt, hoelang deze daar blijft en welke effecten en bijwerkingen de stof daar heeft. Dit is niet of nauwelijks te bestuderen in celkweek.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. *Er zullen eerst pilot-experimenten worden uitgevoerd met een kleine groep muizen om de juiste proefopzet te bepalen. Een nieuwe stof zal eerst in één experiment worden onderzocht op effectiviteit en bijwerkingen, voordat er uitgebreidere experimenten worden uitgevoerd. Waar mogelijk, worden meerdere metingen in hetzelfde dier uitgevoerd in plaats van metingen in verschillende dieren. Naar aanleiding van vragen over de statistische onderbouwing hebben onderzoekers echter opgenomen dat voor overleving (in metastase modellen) naar biologische relevantie gekeken zal worden, omdat statistische relevantie veel grotere aantallen dieren vereist. Hiermee zijn aantallen met bijna 25% toegenomen, maar is voorkomen dat de resultaten niet geïnterpreteerd kunnen worden. Daarnaast is een aanpassing die de DEC had verzocht niet doorgevoerd in bijlage 2: volgens de uitgewerkte experimenten zijn 744 dieren nodig die de DEC kan terugrekenen, maar in de tabel in bijlage 2 bij B 'dieren' worden 736 dieren vermeld. De DEC is uitgegaan van de navolgbare 744 dieren.*
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. *De onderzoekers gebruiken sedatie/ verdoving tijdens scans en operaties en dienen analgesie toe voor en na ingrijpende operaties. De analgesie worden ook continu geëvalueerd aan de hand van observaties in het gedrag van de dieren na afloop. Behalve door de operaties ondervinden de dieren ongerief door tumorgroei en het ontstaan van uitzaaiingen. Onderzoekers hebben uitgebreide scorelijsten opgesteld om de symptomen hiervan objectief vast te leggen en om te kunnen bepalen dat een HEP moet worden uitgevoerd.*
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood *om na afloop bloed, organen en tumorresten uit te kunnen nemen voor verder onderzoek.* De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.

20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing, omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk *het onderzoek naar de ontwikkeling van verschillende soorten senescente cellen in muismodellen voor kanker onder verschillende condities (tijdens metastasering of na chemotherapie behandeling) en het onderzoeken of bepaalde stoffen dit proces kunnen remmen. Het uiteindelijke doel van het project is het identificeren van nieuwe behandelingen die in de kliniek toegepast zouden kunnen worden en voor welke kankersoorten dan specifiek.*

De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het onderzoeksveld en de behoeften vanuit oncologen en hun patiënten hetgeen de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren rechtvaardigt.

2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de 4734 proefdieren plaats, met voor 1636 dieren mild, voor 2997 dieren matig en voor 201 dieren ernstig ongerief.

Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat patiënten met een kankertype dat senescente cellen ontwikkeld, met grote kans op onbehandelbare uitzaaiingen een betere overlevingskans zullen hebben omdat de behandeling de ontwikkeling zal remmen. Het is aannemelijk dat de fundamentele en translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. De IvD heeft aangegeven kritisch te zullen zijn bij de beoordeling van de protocollen op experiment niveau waar sprake kan zijn van biologische relevantie en waar van statische relevantie en daar zal een statisticus bij betrokken zijn.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat *het onderzoek naar de ontwikkeling van verschillende soorten senescente cellen in muismodellen voor kanker onder verschillende condities (tijdens metastasering of na chemotherapie behandeling) en het onderzoeken of bepaalde stoffen dit proces kunnen remmen* een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de deels beperkte en deels aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De DEC heeft de belangen van de ontwikkelaar van de stoffen die het op de markt zal gaan brengen als een commercieel belang ingeschat en kent daar geen waarde aan toe. De relatie tussen het directe en het uiteindelijke doel is voldoende helder. Het is

aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee 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 vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een *meerderheidsstandpunt*. *Eén lid heeft zich onthouden omdat het bij de behandeling van het oorspronkelijke dossier niet aanwezig was.*

3. De volgende knelpunten is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies. *Na de eerste beoordeling is o.a. een vraag gesteld over de onderbouwing van aantallen dieren per experimentele groep. Dit heeft bij de onderzoekers geleid tot een uitgebreider literatuur onderzoek waaruit is gebleken dat in bepaalde gevallen beter gekeken kan worden naar biologische relevantie dan naar statistische relevantie omdat met name metastasemodellen (de modellen waarin de onderzoekers voornamelijk geïnteresseerd zijn) veel variatie vertonen. Hierdoor is het volgens hen lastig om een therapeutisch effect goed te kunnen beoordelen. Met hogere aantallen dieren kan wel een statistisch significant verschil worden aangetoond in deze variabele modellen. Echter, als hiervoor meer dan 25 dieren nodig zijn, is ofwel de variatie te groot, ofwel het therapeutisch effect te klein om biologisch relevant te zijn. Dit aantal is gebaseerd op meerdere publicaties, waarnaar in de bijlage wordt verwezen. Het is enerzijds jammer dat de onderzoekers nu pas bij een herziening van de aanvraag het aanvullende literatuuronderzoek hebben uitgevoerd, maar anderzijds kan daarmee voorkomen worden dat het experiment data oplevert die onvoldoende of niet geïnterpreteerd kunnen worden.*



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht



Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD11500202418434

Bijlagen

2

Datum 11 oktober 2024

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 oktober 2024. Het gaat om uw project "Targeting aggressive cancer through treatment with compounds against cell scarring, enescence and metastasis". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD11500202418434. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

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 oktober 2024

Aanvraagnummer:

AVD11500202418434

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Senior onderzoeker
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2025
Geplande einddatum: 1 januari 2030
Titel project: Targeting aggressive cancer through treatment with compounds against cell scarring, enescence and metastasis
Titel niet-technische samenvatting: Tegengaan van agressieve kanker met behulp van stoffen tegen littekencellen, enescence en uitzaaiingen
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500, 3508 GA UTRECHT
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl


Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.937,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: Utrecht
Datum: 11 oktober 2024



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD11500202418434
Bijlagen
2

Datum 11 oktober 2024
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 11 oktober 2024
Vervaldatum: 10 november 2024
Factuurnummer: 2418434
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD11500202418434	€ 1.937,00

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

From: info@zbo-ccd.nl
To: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#)
Cc: [REDACTED] dec-utrecht@umcutrecht.nl
Subject: Aanhouden AVD11500202418434
Date: dinsdag 3 december 2024 09:18:23

CAUTION: This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

Geachte [REDACTED]

Op 11-10-2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Targeting aggressive cancer through treatment with compounds against cell scarring, enescence and metastasis" met aanvraagnummer AVD11500202418434. 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 heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

Kunt u in uw NTS onder 'Reasons for the planned fate of the animals after the procedure' onderbouwen waarom de dieren na afloop van de experimenten zullen worden gedood?

In de titel van uw NTS gebruikt u de term 'senescence'. Deze term zal door het algemene publiek als lastig worden beschouwd, waardoor de titel niet navolgbaar kan zijn. Kunt u deze term aanpassen?

Onduidelijkheden

De aantallen dieren genoemd in bijlage 3.4.3.2 onder 'B. The animals – Numbers' komen niet overeen met de aantallen dieren genoemd in de bijlagen dierproeven onder de tabel van 'B. The animals'. Kunt u dit in met elkaar overeenstemming brengen?

In de bijlagen dierproeven verwijst u naar welfare scoring lists die u zult hanteren. Kunt u deze toevoegen aan de bijlagen dierproeven?

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



www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

PER E-MAIL

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC
Den Haag

Datum 12 december 2024
Betreft Antwoorden op vragen
Ons kenmerk AVD11500202418434
Uw kenmerk Typ uw kenmerk.

Typ directienaam

Typ afdelingTyp naam
Typ functieTel [000] 000 00 00
E-mailadresGeachte [REDACTED]

Op 11-10-2024 hebben wij bij u een CCD verunningaanvraag ingediend met code AVD11500202418434 en de titel "Targeting aggressive cancer through treatment with compounds against cell scarring, senescence and metastasis". Op 3-13-2024 heeft u ons hierover enkele vragen gesteld. Bij deze willen wij graag van de gelegenheid gebruik maken deze te beantwoorden. Het gaat om de volgende vragen, met onze antwoorden in het blauw:

Niet technische samenvatting

U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

[Antwoord] Deze hebben wij nu als bijlage toegevoegd in het Excel bestand.

Kunt u in uw NTS onder 'Reasons for the planned fate of the animals after the procedure' onderbouwen waarom de dieren na afloop van de experimenten zullen worden gedood?

[Antwoord] Dit hebben wij als volgt verantwoord in het Excel bestand:
De dieren worden niet in leven gehouden na afloop van de experimenten. Deze dieren bevatten kankercellen en zijn daarmee niet (goed) te gebruiken in andere experimenten. Waar mogelijk proberen wij tevens plasma en organen te analyseren, b.v. voor uitzaaiingen. Ook hiervoor moeten de dieren worden gedood.

In de titel van uw NTS gebruikt u de term 'senescence'. Deze term zal door het algemene publiek als lastig worden beschouwd, waardoor de titel niet navolgbaar kan zijn. Kunt u deze term aanpassen?

Bezoekadres:
Heidelberglaan 100
3584 CX UtrechtPostadres:
Huispostnummer Huispostnr.
Kamernummer Kamernr.
Postbus 85500
3508 GA Utrecht

[Antwoord] Hoewel wij begrijpen dat dit in eerste instantie vragen op kan roepen, willen wij toch vragen om deze term te laten staan. Het is immers de essentie van het gehele project. Ook voor een eerdere CCD vergunning is deze term gebruikt in de NTS. We leggen deze al vrij snel uit, waardoor het een van de weinige vaktermen is.

Het is enigszins mogelijk de term te omschrijven, b.v. als roestcellen of onherstelbaar beschadigde cellen, maar eerlijk gezegd levert dit, naar onze ervaring, juist meer vragen op. Vooral ook omdat er specifieke subtypen van deze senescente cellen zijn die die eigenschappen kunnen krijgen – en wat we hier willen onderzoeken.

We hebben in de 3^e zin staan: *Niet herstelde schade kan ervoor zorgen dat cellen eigenschappen krijgen die we omschrijven als "senescent" (= Latijn voor verouderen).*

Waar mogelijk zouden we echt graag de term senescent gebruiken, omdat dit de rest veel makkelijker maakt in de communicatie.

Onduidelijkheden

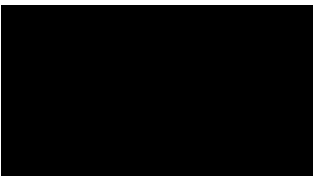
De aantallen dieren genoemd in bijlage 3.4.3.2 onder 'B. The animals – Numbers' komen niet overeen met de aantallen dieren genoemd in de bijlagen dierproeven onder de tabel van 'B. The animals'. Kunt u dit in met elkaar overeenstemming brengen?

[Antwoord] Deze zijn op uw verzoek aangepast.

In de bijlagen dierproeven verwijst u naar welfare scoring lists die u zult hanteren. Kunt u deze toevoegen aan de bijlagen dierproeven?

[Antwoord] Deze zijn op uw verzoek bijgevoegd op pagina 4+5, onder de sectie "Description of animal procedures".

Hoogachtend,



Bijlage(n) 2
Kopie



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD11500202418434

Bijlagen

3

Datum 23 december 2024

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 11 oktober 2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Targeting aggressive cancer through treatment with compounds against cell scarring, enescence and metastasis" met aanvraagnummer AVD11500202418434. 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 1 januari 2025 tot en met 31 december 2029.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2030 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

Procedure

Datum:

23 december 2024

Aanvraagnummer:

AVD11500202418434

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 22 november 2024. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 3 december 2024 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het ingediende format, het beoogde lot van de dieren en gebruikte terminologie in de NTS en de aantallen dieren genoemd in bijlage 3.4.3.2 en het includeren van een welfare scoring list in beide bijlagen dierproeven. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

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

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2030 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

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.

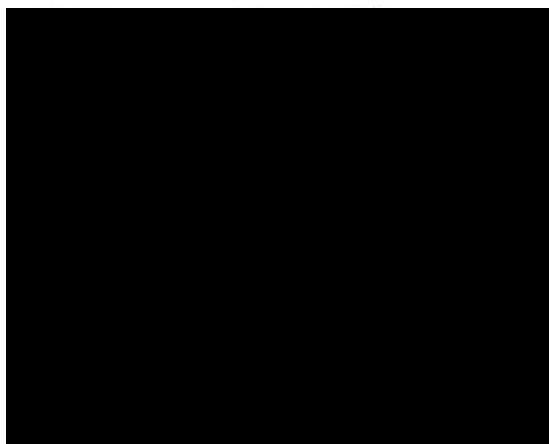
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<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.

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving

Datum:

23 december 2024

Aanvraagnummer:

AVD11500202418434



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2025 tot en met 31 december 2029, voor het project "Targeting aggressive cancer through treatment with compounds against cell scarring, enescence and metastasis" met aanvraagnummer AVD11500202418434, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is Labmanager verantwoordelijk. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 11 oktober 2024
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 25 november 2024;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Analysis of the efficacy of novel compounds in cancer, starting from cancer cell engraftment, zoals ontvangen op 12 december 2024;
 - 3.4.3.2 Analysis of the efficacy of novel compounds in cancer, starting from genetically engineered modified mice (GEMMs), zoals ontvangen op 12 december 2024;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 12 december 2024;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 22 november 2024
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 12 december 2024.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Analysis of the efficacy of novel compounds in cancer, starting from cancer cell engraftment			
	Muizen (Mus musculus)	4.090	4,0% Ernstig 56,0% Matig 40,0% Licht
3.4.3.2 Analysis of the efficacy of novel compounds in cancer, starting from genetically engineered modified mice (GEMMs)			
	Muizen (Mus musculus)	744	5,0% Ernstig 95,0% Matig

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

Aanvraagnummer: AVD11500202418434

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2030 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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:

AVD11500202418434

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:
AVD11500202418434

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

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