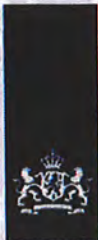


Inventaris Wob-verzoek W20-05									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document wijziging 5885-2	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Postversie van aanvraagformulier, d.d. 3 maart 2020				x		x	x	
2	Toelichting op wijziging, d.d. 3 maart 2020				x		x	x	
3	Elektronische versie van aanvraagformulier, d.d. 3 maart 2020				x		x	x	
4	NTS (versie 1)			x					
5	Projectvoorstel (versie 1)				x			x	
6	Bijlage dierproeven 1 (versie 1)				x			x	
7	Begeleidende e-mail bij ontvangstbevestiging, d.d. 3 maart 2020				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging en factuur, d.d. 3 maart 2020				x		x	x	
9	Verzoek om advies aan DEC, d.d. 3 maart 2020				x		x	x	
10	Interne e-mail over factuur aan kasbeheer, d.d. 3 maart 2020				x		x	x	
11	Kennisgeving aan Vergunninghouder dat de DEC om advies is gevraagd, d.d. 3 maart 2020				x		x	x	
12	E-mail van DEC ter bevestiging van ontvangst van verzoek om advies, d.d. 4 maart 2020				x		x	x	
13	Interne & externe correspondentie inzake adviesaanvraag wijziging projectvergunning dierproeven, d.d. 4 juni 2020				x		x	x	

14	Begeleidende e-mail bij DEC-advies, d.d. 3 juni 2020				x		x	x	
15	DEC-advies, d.d. 3 juni 2020				x				
16	NTS (versie 2)			x					
17	Projectvoorstel (versie 2)				x			x	
18	E-mail ter bevestiging van ontvangst van DEC-advies, d.d. 4 juni 2020				x			x	
19	Ontvangstbevestiging inzake de wijziging van vergunning, d.d. 6 juli 2020				x		x	x	
20	Factuur inzake de wijziging van vergunning, d.d. 6 juli 2020				x		x	x	
21	Interne Concept Adviesnota, d.d. 7 juli 2020				x		x	x	x
22	Interne e-mail (1) inzake overleg over tweede beoordeling, d.d. 7 juli 2020				x		x	x	x
23	Interne e-mail (2) inzake overleg over tweede beoordeling, d.d. 7 juli 2020				x		x	x	
24	E-mail met verzoek om aanvullende informatie, d.d. 13 juli 2020				x		x	x	
25	E-mail met kennisgeving aan DEC van verzoek om aanvullende informatie, d.d. 13 juli 2020				x		x	x	
26	Reactie op verzoek om aanvullende informatie, d.d. 23 juli 2020				x		x	x	
27	NTS (versie 3)			x					
28	Projectvoorstel (versie 3)				x			x	
29	Bijlage dierproeven 1 (versie 2)				x			x	
30	Interne aankondiging schriftelijke ronde, d.d. 3 augustus 2020				x		x	x	

40	Interne e-mail (3) correspondentie betreffende on- hold plaatsing beschikking, d.d. 10 augustus 2020					x		x	x	
41	Interne-mail (4) correspondentie inzake voorgestelde correctie op beschikking, d.d. 7 augustus 2020					x		x	x	
42	Interne-mail (5) correspondentie inzake voorgestelde correctie op beschikking, d.d. 10 augustus 2020					x		x	x	
43	Interne-mail (6) correspondentie inzake voorgestelde correctie op beschikking, d.d. 10 augustus 2020					x		x	x	
44	Interne-mail (7) correspondentie inzake voorgestelde correctie op beschikking, d.d. 10 augustus 2020					x		x	x	
45	Interne-mail (8) correspondentie inzake voorgestelde correctie op beschikking, d.d. 10 augustus 2020					x		x	x	
46	Interne-mail (9) correspondentie inzake voorgestelde correctie op beschikking, d.d. 10 augustus 2020					x		x	x	
47	Interne-mail (10) correspondentie inzake voorgestelde correctie op beschikking, d.d. 10 augustus 2020					x		x	x	



25 FEB 2020

5885-2

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 bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

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 type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	10.2.g
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats IBAN Tenaamstelling van het rekeningnummer	10.2.g 10.2.e 10.2.g
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	10.2.g
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	10.2.e
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 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 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn 10.2.g
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 8 - 2018
- Einddatum 31 - 7 - 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Identificatie en isolatie van peptiden voor passage door de bloed-hersenbarrière ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen hersenkanker
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC 10.2.g
- Postadres
- E-mailadres

25 FEB 20204

Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
 Wijziging € 884 Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer. Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). 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 F 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	10.2.e
Functie	
Plaats	10.2.g
Datum	10.2.e
Handtekening	

10.2.g

Date February 21, 2020

Our ref 10.2.g

Your letter

10.2.g

10.2.e

Subject 10.2.g

Dear members of the CCD, dear members of the DEC,

The goal of the study is to identify peptides (small antibodies) that are able to cross the blood-brain barrier (BBB) through a specific receptor-mediated transport mechanism and ultimately be later used to deliver functional therapeutic payloads specifically to the brain. As described in the original study proposal, we used a method that has been successful in mice. In the study described under the original approval 10.2.g, it has been possible to identify an antibody that is a good candidate for follow up testing (further called compound). This compound recognizes and binds with high affinity to recombinant macaque and human Transferrin Receptor 1 (TfR1). It also binds and internalizes with high efficiency to human cerebral microvessel endothelial cells (hCMEC/D3).

Based on those characteristics the compound is ranked highly for follow up confirmatory brain penetration tests in animals. To proceed this compound and in addition test if CSF can be used as predictor of brain enrichment of selected compounds, we propose a pilot to test the compound's brain delivery in comparison to a selected negative control antibody. In addition to the brain sampling, we will also collect CSF, which will be evaluated for its suitability to be used as a brain surrogate for future work and testing of alternative, promising antibodies without the need of sacrificing the animals. When successful, we will include this in a new application for further testing.

The original applications (including both macaque species) is sent, with all additions marked in red.

Best Regards,

10.2.e

10.2.e

Encl: 4

10.2.g

10.2.g

10.2.g



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 bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

- Ja > Vul uw deelnemernummer in
- Nee > U kunt geen aanvraag doen

10.2.g

- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde

10.2.g

10.2.e

- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

KvK-nummer

Straat en huisnummer

Postbus

Postcode en plaats

IBAN

Tenaamstelling van het rekeningnummer

10.2.g

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

10.2.e

- 1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |
- 1.7 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 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 **10.2.g**
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 8 - 2018 |
| Einddatum | 31 - 7 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Identificatie en isolatie van peptiden voor passage door de bloed-hersenbarrière ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen hersenkanker
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---------------|
| Naam DEC | 10.2.g |
| Postadres | |
| E-mailadres | |



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Identificatie en isolatie van peptiden voor passage door de bloed-hersenbarrière ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen hersenkanker
1.2 Looptijd van het project	01-08-2018 tot 31-07-2021
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Peptiden, Bacteriofagen, bloed-hersen barrière, kankertherapie, makaken

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Kwaadaardige tumoren in de hersenen vertegenwoordigen ongeveer 3% van het aantal kankergevallen wereldwijd. Deze kankers geven echter zeer grote problemen in de patiënten en hebben echter een zeer slechte prognose. De meest algemene en dodelijke vorm van hersenkanker is het glioblastoom, met een 5-jaar overleving van slechts 4% in patiënten van middelbare leeftijd. Daarnaast zaaien ook kankers van andere organen zich regelmatig uit naar de hersenen. Op dit moment zijn de behandelingsmogelijkheden beperkt. Van verschillende specifieke antilichamen is aangetoond dat deze effectief kunnen zijn tegen verschillende kankers. Echter, door de bloed-hersen barrière kunnen
---	--

deze antilichamen niet de hersentumoren bereiken. Daarom zal in dit project onderzoek worden gedaan naar het ontdekken van specifieke stukjes eiwit (peptiden) die binden aan speciale structuren op de bloed-hersenbarrière en deze daarna wel kunnen passeren. Deze peptiden kunnen dan in een vervolgstudie gebonden worden aan antilichamen die op deze manier dan mogelijk wel de bloed-hersenbarrière kunnen passeren en de tumoren bereiken. In muizen is een techniek ontwikkeld waarbij zogenaamde bacteriofagen werden gebruikt die verschillende stukjes eiwit op hun oppervlak hebben. Deze methode resulteerde in de identificatie van eiwitstukjes die de bloed-hersenbarrière bij muizen kunnen passeren. De eigenschappen van de bloed-hersenbarrière van de muis en mens zijn echter beperkt vergelijkbaar. In tegenstelling tot de muis zijn de resusaap en de mens met betrekking tot de bloed-hersenbarrière heel vergelijkbaar. Daarom worden voor deze studie apen gebruikt om de latere kans op slagen bij patiënten zo groot mogelijk te maken. Apen worden hiertoe ingespoten met zogenaamde bacteriofagen die allemaal verschillende eiwitstukjes die mogelijk interessant zijn voor het doel van dit onderzoek op hun oppervlak hebben. De bacteriofagen die de juiste eiwitstukjes hebben om de bloed-hersenbarrière te kunnen passeren kunnen op deze wijze uit de hersenen geïsoleerd worden. Dit moet enkele keren herhaald worden omdat dit om heel kleine aantallen gaat en om alleen de juiste stukken te identificeren en isoleren die later gebruikt kunnen worden voor kankertherapie bij patiënten.

Indien een geschikte kandidaat geïdentificeerd is, zal een pilot uitgevoerd worden om te zien of ook ruggenmergvloeistof verkregen via een ruggenprik bruikbaar is om de beste kandidaten voor verdere ontwikkeling te selecteren.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Het project zal resulteren in de isolatie en identificatie van specifieke eiwitstukken die de bloed-hersenbarrière kunnen passeren. Dit project vormt de basis voor het ontwikkelen van de nieuwe, beoogde kankertherapie. Bij vervolgonderzoek van het voorgestelde project zullen deze eiwitstukken gebruikt worden om te koppelen aan antilichamen om op termijn mogelijk hersentumoren in patiënten te kunnen behandelen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

20 makaken (Macaca mulatta; Macaca fascicularis)

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Gedurende de studie zijn de dieren onder volledige narcose waarna de dieren direct worden ge-euthanaseerd. Bij selectie van een goede kandidaat zullen maximaal 8 dieren bijkomen uit narcose in hun thuishok waarna de dieren na 16-20 h onder volledige narcose worden ge-euthanaseerd.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

maximaal 12 dieren terminaal (non-recovery), maximaal 8 dieren licht

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Omdat de hersenen nodig zijn worden de dieren ge-euthanaseerd

4 Drie V's

4.1 Vervanging

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdierlijke alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Om te bepalen of peptiden de bloed-hersenbarrière kunnen passeren na inspuiten zijn intacte, levende dieren nodig. Er bestaan geen *in vitro* systemen om zowel de binding, transport en verrijking van de peptiden in de hersenen na systemische toediening volledig te onderzoeken. Dit kan deels met behulp van zogenaamde transcytose assays, maar er bestaan momenteel nog geen gevalideerde *in vitro* systemen voor het onderzoek naar transport van grotere stoffen door de bloed-hersenbarrière van primaten (mensen en apen). Er wordt geprobeerd nieuwe muissystemen voor dit type onderzoek op te zetten. Echter, in tegenstelling tot bij de apen, zijn deze op dit moment onvoldoende voorspellend voor de effecten in de mens.

4.2 Vermindering

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Alle methoden en procedures voor de identificatie van de peptiden die de bloed-hersenbarrière kunnen passeren via een specifiek mechanisme zijn eerst onderzocht en geselecteerd met (in zo ver mogelijk) *in vitro* selectiemethoden, zoals binding *in vitro* aan geselecteerde transportmoleculen en *in vivo* in muizenmodellen voordat de stap naar de makaken wordt gemaakt.

4.3 Verfijning

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersoort(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De studies vinden plaats in makaken. In tegenstelling tot bij andere diersoorten, vertonen de transportmechanismen over de bloed-hersenbarrière **in makaken** de grootste overeenkomsten met die bij de mens. Deze overeenkomst is belangrijk omdat de geselecteerde peptiden gebruikt zullen gaan worden voor het opzetten van nieuwe therapieën tegen hersenkanker bij de mens. De dieren worden gedurende de hele duur van het experiment onder narcose gehouden waardoor ongerief zo veel mogelijk wordt voorkomen.

Als uit deze studie blijkt dat we door het verkrijgen van ruggenmergvloeistof ook kunnen voorspellen hoe goed de passage van de peptiden is door de bloed-hersenbarrière, kunnen verder studies plaatsvinden zonder dat de dieren ge-euthanaseerd hoeven te worden.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De dieren zijn gedurende de gehele procedure onder narcose, waarna euthanasie plaatsvindt. Gedurende de narcose wordt het welzijn van de dieren bewaakt door ervaren dierenartsen.

Dieren die intraveneus een injectie krijgen en 16-20 uur later ge-euthanaseerd worden blijven in hun thuishooi. Anders dan bijkomen uit sedatie worden geen negatieve effecten verwacht en gedurende deze tijd zullen ze geobserveerd worden door de diervverzorgers.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Form Project proposal

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

1 General information

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

10.2.g

Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

Basic research

Translational or applied research

Regulatory use or routine production

Research into environmental protection in the interest of human or

Research aimed at preserving the species subjected to procedures

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Malignant tumors of the brain and central nervous system (CNS) are relatively rare, representing approximately 3% of new cancer cases estimated worldwide. However, they cause significant morbidity and have a very poor prognosis. The average survival rate in adults with a primary malignant brain tumor is only 34.7%. Glioblastoma is the most common and aggressive malignant brain tumor and the treatment options are very limited (1). The current five-year survival rate is only 4% in patients aged 55-64. In children and adolescents, primary brain tumors are the leading cause of cancer-related death, surpassing leukemia. Additionally, most cancers that arise in other organs of the body have the ability to metastasize to the brain. An estimated 24-45% of all cancer patients have brain metastases, which is associated with poor survival and high morbidity. Consequently, brain cancer remains an area of urgent and unmet medical need.

Antibodies that specifically target certain antigens on tumor cells have proven to be highly effective in the treatment and/or eradication of a variety of highly malignant forms of cancers. However, many potential antibody therapies are not effective in brain cancer, largely because they are unable to cross the blood-brain barrier (BBB) (2). Recently, the collaborating institute has isolated small antibody binding domains (Variable new antigen receptor (VNAR) domains) to specific transporters concentrated in the BBB followed by rapid and robust penetration into the brain of mice using phage display libraries (3). Known transporters of the BBB that can be targeted for this purpose are e.g. transferrin receptors, low-density lipoprotein receptors and leptin receptors (4) VNAR domains are the smallest antibody recognition peptides that can be combined with monospecific antibodies to develop bispecific agents to be transported over the BBB. These peptides are currently studied in order to develop new treatment options for human diseases, including cancer (5,6). Mouse studies have demonstrated that some of these combinations can be readily pulled into the brains of mice. However, there are significant differences in receptor-mediated transport between distantly related species that preclude the direct translation of these mouse studies to humans. Quantitative proteomics studies have shown that there are major differences in the expression of BBB transporters between rodent and human but that the profile is nearly identical between primates (macaque/marmoset/human) (7-10).

There are several systems for the delivery of molecules into the brain that are currently investigated for delivery of molecules into the brain. In contrast to the use of phage libraries displaying VNAR, 2-BBB technology use glutathione PEGylated liposomes to delivery small molecules and is not suitable for the delivery of large molecules. Nanoparticle delivery is another approach being intensively explored but has also yet to achieve successful clinical translation. There are several programs for the development of new platforms to deliver large molecules using a variety of receptor-mediated transport systems but until now these platforms either do not have adequate pharmacokinetic properties or have safety issues that hamper clinical development.

Various in vitro screens have been developed to identify antibodies that bind to receptors. However, there are currently no validated in vitro transcytosis systems for the primate systems available that can predict the different aspects of in vivo binding and transport over the blood-brain barrier. None of the available in vitro methods currently provide antibodies or peptides of sufficient potency or safety for general clinical translation. For instance, many antibodies to the transferrin receptor selected in vitro have adverse effects in vivo because they interfere with function in vivo by either blocking transport of the endogenous ligand or targeting the receptors for lysosomal degradation. In contrast, injection of a VNAR phage display library that was pre-selected on transferrin receptor in vitro resulted in the identification of a highly potent binder that can cross the BBB without competing with transferrin or disrupting the receptor in mice. Using this phage display approach, it has been demonstrated that it is possible to isolate a highly potent and effective carrier for the delivery of large molecules across the BBB in the mouse system. Since there are major differences between the mouse and human BBB and their respective transporter sequences (7-10), the same approach for the identification and isolation of effective peptides (VNAR) that has proven successful in mice will be used in macaques to allow better translation to humans.

The process first involves a selection on purified recombinant receptor protein, to enrich the library with binders to the receptor, covering many different epitopes across the surface. To obtain domains to a

specific transporter, the VNAR phage display library is pre-selected in vitro on selected purified proteins. This pre-selected library, which already has been developed by the collaborators, will be injected into macaques to find the very rare binder that can cross the BBB through an active transport mechanism without disrupting it. Crossing the BBB is a very rare event and since the properties required for this are not known, many different sequences have to be tested. The most efficient way to do this is to test a large phage library containing many possible small antibody binding domains (VNAR). The phage library constructed by the collaborators contains a huge number of these VNAR domains ($>1 \times 10^{10}$) and each has a unique antigen binding sequence.

1. Sastry RA. et al, 2018. The impact of surgery on survival after progression of glioblastoma: a retrospective cohort analysis of the contemporary patient population. *J. Clin Neurosci* S0967-5868: 31541.
2. Sousa F. et al, 2018. Therapeutic monoclonal antibodies delivery for the glioblastoma treatment. *Adv Protein Chem Struct Biol* 112:61
3. Greenwood J et al, 2017. Current research into brain barriers and the delivery of therapeutics for neurological diseases: a report on CNS barrier congress London, UK, 2017. *Fluids Barriers CNS*, 14:31.
4. Zeiadeh I et al. 2018. Strategies for enhancing the permeation of CNS-active drugs through the blood-brain barrier, a review. *Molecules* 23:1289
5. Könning D et al. 2017. Semi-synthetic vNAR libraries screened against therapeutic antibodies primarily deliver anti-idiotypic binders. *Sci Rep* 7:9676.
6. Iezzi ME et al. 2018. Single-domain antibodies and the promise of modular targeting in cancer imaging and treatment. *Front Immunol* 9:273.
7. Uchida Y. et al. 2011, Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* 117:333
8. Hoshi Y et al. 2013. Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmosets. *J Pharm Sci* 102:3343.
9. Syvänen S. et al. 2009. Species differences in blood-brain transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metabolism and Disposition* 37:635.
10. Ito K. Et al. 2011. Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci* 100:3939.

3.2 Purpose

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

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

The overall aim is to develop new approaches to combat brain tumours. The brain-penetrating peptides (VNAR) identified and isolated in this project will be linked to therapeutic monoclonal antibodies to transport them into the brain to treat glioblastoma and CNS lymphoma in patients. However, the approach and its applications are much broader. For example, this same approach can be used to identify peptides to different transporters in the BBB that will have different pharmacology. It is also possible to either genetically or chemically link the delivery peptide with a wide variety of large molecules in addition to monoclonal antibodies, such as enzymes, growth factors, antisense oligonucleotides, toxins and small molecules. These new therapeutic approaches may be useful in a wide range of CNS diseases besides brain cancer, including genetic disorders, neurodegenerative diseases, and CNS autoimmune diseases.

The specific objective of this project is to identify and isolate specific peptides (small antibody binding domains, so called VNAR) that are able to cross the BBB through a specific receptor-mediated transport mechanism in vivo in primates using a phage library expressing a large range of different VNAR. The phage library has been constructed by the collaborating partner and is available. The method that will be used

for identification and isolation of the VNAR has been developed and used in mice by the partner. This project is a collaboration with the experts in the construction of above-mentioned products and experts in non-human primate research, which makes the project very likely to succeed.

3.3 Relevance

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

This project concerns applied, translational research on development of new tools to combat brain diseases, e.g. brain tumours. There are currently limited treatment possibilities for these devastating cancers and new treatment possibilities are therefore of major social importance. This project will be instrumental to identify and isolate small antibody binding domains (VNAR) that readily bind to receptors of the BBB and penetrate the brain without toxicity or influencing receptor activity. The VNAR identified in this project will subsequently be used to fuse them with monoclonal antibodies for future clinical research.

3.4 Research strategy

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

The overall strategy is to develop a brain delivery system using small antibody binding domains with the most potent activity that are optimized for the BBB transport system of primates. Peptides that bind a specific transport receptor are displayed on the surface of phage particles. This phage library expressing a large variety of VNAR is injected intravenously under full anaesthesia and the particles are allowed to circulate throughout the body for 2 to maximally 3 h hours. During this time, bacteriophages that display the correct VNAR will bind to receptors on the BBB and some of them will penetrate the brain parenchyma. The animals will remain under anaesthesia during the whole procedure. Anaesthesia has no effect on the binding and penetration of the VNAR-expressing bacteriophages. While still under anaesthesia the animals will be perfused to remove bacteriophages from the blood vessels and the animal will be euthanized. The brain is removed and fractionated to recover the phage particles from the brain parenchyma. The recovered bacteriophages are amplified in bacterial culture *in vitro* and purified to remove contaminants. Next, the recovered bacteriophage cultures are injected into other animals and the same procedures as described above will be performed. The starting library has only very few phages carrying a specific sequence that will bind to specific receptors and translocate into the brain. Once injected into the animal, most non-binding particles are rapidly cleared. The only way to detect whether a useful VNAR is correctly identified, is to re-inject more copies and determine if there is a corresponding increase in the number found in the brain. Two repeats of injection (in total three rounds) are the bare minimum required to detect a clear result regarding receptor binding and to obtain sufficient material for further analysis. This method targeting specific 'address codes' on the endothelium of particular organs using phage display peptide libraries was first described in 1996 by Pasqualini & Ruoslahti ([Nature](#) 380(6572):364-6). This has been successfully adapted for crossing of the capillary endothelium of the BBB.

The platform and procedures that have been developed were highly successful in mice and can be directly applied to non-human primates with only minor modifications. It is likely that the same approach will be successful in primates for several reasons: 1) primate and mice use the same transporter systems to carry essential nutrients into the brain despite variations in their receptors; 2) pre-selected phage libraries that contain large numbers of unique peptide sequences to many different points on receptor are already prepared by the collaborating party; and 3) by performing various repeats of selection *in vivo*, binders that are the most functionally important and tailored to the BBB transport system of primates can be isolated. This project is a collaboration with the experts in the construction of above-mentioned products and experts in non-human primate research.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

The major aim is specific enrichment of bacteriophages to identify binding peptides of the BBB for later development of novel treatments for brain tumours. The project consists of repeated passage of the isolated bacteriophages in non-human primates in order to enrich the population that recognizes the specific receptors in the primate BBB transport system. The selection of leads for further characterization and development is determined by the copy number of each peptide sequence found in the brain parenchyma after each round of injecting the mixture. The leads with the best biophysical properties and brain uptake will be used to produce bi-specific delivery peptide-antibody products for targeting brain tumours (not included in this project)

When a first selection of a promising compound for brain penetration has been done, we will test the compound's brain delivery in comparison to negative control antibody, which was selected based on no brain penetration in mice. Animals will be injected intravenously and after 16-20 h sedated for collection of CSF and blood followed by euthanasia and isolation of the brain. These data will be used to evaluate if CSF is suitable to be used as a brain surrogate for future work and testing of alternative antibodies without the need of sacrificing the animals.

The ultimate aim is to identify new compounds that pass the BBB and can be used for further development of novel treatments for brain tumours.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

In the first part of the study bacteriophage pools are passed in different macaques three times. If enrichment of the pools results in the selection of an interesting compound, this compound will be used in a pilot study to determine if for further selection CSF can be used as brain surrogate to prevent euthanasia of animals for further selection of interesting antibodies.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

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

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.



Serial number	Type of animal procedure
1	Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides

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.

The goal of the study is to identify peptides (small antibody that are able to cross the blood-brain barrier through a specific receptor-mediated transport mechanism. A method is used that has been successful in mice but due to large differences in receptors between mice and human it is not possible to translate the mouse data directly for clinical studies. Because of the higher genetic similarities with humans, further selection and identification of relevant peptides are performed in macaques before going into clinical trials (1-4). The phage library expressing a large number of VNAR domains is injected intravenously under full anaesthesia and the particles are allowed to circulate throughout the body for approximately 2 to 3 hrs, while the animals remain anaesthetized. The animals are then perfused to remove non-binding or non-penetrating bacteriophages from the blood vessels. The animals are euthanized (while still under terminal anaesthesia) and the brain is removed and fractionated to recover the phage particles expressing the specific VNAR from the brain parenchyma.

After recovery of the bacteriophages from the brain parenchyma, the most active VNAR are found in the brain parenchyma. The number of copies of each particle from the brain is amplified by growth in bacterial culture in vitro. The starting library has only a very few phages carrying relevant binding sequences and once injected into the animal, many particles are rapidly cleared. For further enrichment and to ensure that the signals are real, it is necessary to inject more copies and determine if there is a corresponding increase in the number found in the brain. Therefore, the in vitro cultured bacteriophages isolated in the first round will be injected into new animals using the same procedures, followed by another isolation and reinjection into new animals in order to enrich the libraries and enhance the specificity as much as possible (in total three rounds of passage).

When an antibody that is a good candidate for follow up testing (further called compound) is selected a pilot study will be done in maximal 8 animals to study if CSF can be used a surrogate for brain penetration. The compound will be identified and amplified using next generation sequencing throughout the selection process. The compound's brain delivery will be compared to a negative control antibody, selected based on no brain penetration in mice. In addition to the brain sampling, also CSF will be collected and evaluated for its suitability to be used as a brain surrogate for future work and testing of alternative antibodies without the need of sacrificing the animals in further studies (will be part of a new license application).

1. Uchida Y. et al. 2011, Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* 117:333
2. Hoshi Y et al. 2013. Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmosets. *J Pharm Sci* 102:3343.
3. Syvänen S. et al. 2009. Species differences in blood-brain transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metabolism and Disposition* 37:635.
4. Ito K. Et al. 2011. Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci* 100:3939.

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

The first part of the study concerns an in-life procedure that only involves anaesthesia of the animals followed by an intravenous administration of the bacteriophage library into the carotid artery to avoid the 1st pass through the liver. After a 2-3 hour interval under continuous anaesthesia and temperature control, the blood is cleared from the tissues by cardiac perfusion and the animal is euthanized by administering a dose of a lethal anaesthetic. The brain is removed post mortem. This procedure is identical to the approach in mice to identify highly potent VNAR that can carry a wide range of large molecules into the brain.

After selection of a promising candidate, 4 macaques are intravenously injected with the compound (2 animals) or a negative control (2 animals) under sedation. After recovery, the animals will remain housed in their home cage for another 16-20 h. The timepoint is selected based on the previous experience with rodents where the maximum brain exposure for majority of positive BBB transporters was observed to be 16-20h post injection. After this time, the animals will be anaesthetized, and CSF and (circulatory) blood will be taken from the animals followed by clearing of the blood from the tissues by cardiac perfusion and euthanasia. The brain will be removed post-mortem. This procedure will be identical to the approach described above. The amount of compound in the brain and CSF versus that in the circulation provides knowledge of the penetrability of the compound.

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

A total of 6 animals (3 rounds of 2 animals) is the minimal number of animals required for the experiment. There are no statistical tests to determine the number of animals required. The numbers are based upon earlier studies and experiences in mice in order to obtain sufficient enriched material for further research. In the experience of the collaborator, three rounds including 2 animals per round with in total three rounds are required to obtain sufficiently enriched populations that can be used in future clinical studies with sufficient assurance that only the most relevant and active peptides are identified and isolated. The starting library has only very few phages carrying a specific sequence that will bind to specific receptors and translocate into the brain. Once injected into the animal, most non-binding particles are rapidly cleared. The only way to detect whether a useful peptide is correctly identified, is to inject the enriched culture and determine if there is a corresponding increase in the number found in the brain. Two repeats of injection (in total three rounds) are the bare minimum required to detect a clear result regarding receptor binding

and to obtain sufficient material for further analysis. This method targeting specific receptors of particular organs using phage display peptide libraries was adapted from earlier studies (R. Pasqualini and E. Ruoslahti, 1996. Nature 380:364). Two animals per round are also considered to be the very minimum number to ensure that the experiment is reliable and reproducible. This is essential to ensure that only the most promising peptides are isolated for further development and future clinical studies. Experimental error can arise at a number of steps to artificially amplify a particular sequence or to increase the background noise. Seeing the same sequence enriched independently in two animals is essential to confirm that a particular brain-penetrating VNAR is not unique to a single individual and to confirm that the experiment has worked technically.

To pilot if CSF can be used as surrogate for brain penetration, we estimate that 2 animals injected with the most promising candidate and 2 animals injected with a control antibody will be sufficient to make an informed decision for future studies regarding the use of CSF. Controls are required to determine the enrichment in the CSF of the penetrating antibody compared to the non-penetrating antibody. The estimation is based on earlier studies and experiences in mice in order to obtain meaningful data for evaluation. In case of unexpected technical failures or contradicting results, we would like to repeat the study once after consultation with, and approval by the Animal Welfare Body.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

In this study, adult macaques (*Macaca mulatta* or *Macaca fascicularis*) will be used. It is not expected that there are gender-dependent effects, therefore males and females can be included. All animals will be obtained from the in-house breeding colony. In contrast to rodents, macaques and humans show a comparable profile of expression and structure of BBB transporters (1-4). Therefore, in this study macaques are used to identify and isolate the specific peptides that can cross the BBB. Based on the mouse studies, a total of 6 animals is the minimal number of animals required for the specific selection of peptides that bind to selected transporters and penetrate the brain. In case additional enrichment is needed, or if other, newly identified BBB transporters need to be specifically targeted, a maximum of 6 more animals is anticipated to be required. In case the additional animals are needed, this will first be discussed with the Animal Welfare Body. A maximum of 12 animals will be used for this part of the project. In addition, a maximum of 8 animals (4 in study 1 and only in case of a repeat) will be used to study if CSF can be used as surrogate for brain penetration to prevent the need for euthanasia and perfusion in future selection studies.

1. Uchida Y. et al. 2011, Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* 117:333
2. Hoshi Y et al. 2013. Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmosets. *J Pharm Sci* 102:3343.
3. Syvänen S. et al. 2009. Species differences in blood-brain transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metabolism and Disposition* 37:635.
4. Ito K. Et al. 2011. Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci* 100:3939.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

For this project, animals will be selected that either have been used in previous studies (with maximal moderate discomfort) provided that prior treatments did not affect the BBB integrity or that must be euthanized for veterinary or ethical reasons, such as chronic diarrhea or social incompatibility. Final selection will be done in consultation with, and approval by the Institute's Animal Welfare Body and the Institute's veterinarians.

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.

D. 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.

Many in vitro screens have been carried out to identify antibodies that bind transporters of the BBB such as recombinant proteins or using over-expressing cells and identification of surface binding or internalization in culture. Validated in vitro transcytosis assays are not yet available for the primate system. The partner is currently working on validation of the mouse system using carriers that are highly effective in vivo but have yet to find an in vitro/in vivo correlation. Hopefully these in vitro BBB systems will become available sometime in the future, but at this point it is difficult to predict when. None of the in vitro methods have provided antibodies or peptides of sufficient potency or safety to date for general clinical translation. Many antibodies to e.g. the transferrin receptor have adverse effects because they interfere with function in vivo by either blocking transport of the endogenous ligand or targeting the receptors for lysosomal degradation. There are currently no in vitro methods to further determine passage of the BBB and obtain the required enrichment. Non-human primates are required since the BBB transport receptor is nearly identical to humans, while the receptor in rodents is more distant. To limit the use of primates, all of the methods and procedures to identify peptides that cross the BBB using a specific transport mechanism were developed over a several year period using both in vitro selection on recombinant proteins (structural studies) and in vivo selection in mice (proof-of-principle and first selection). Therefore, only a minimum number of animals is required to translate this approach to humans. Animals from previous studies can be used as long as prior treatments did not affect the BBB integrity. To prevent discomfort, the animals will be kept under anaesthesia during the entire study (2-3 h) after which the animals will be immediately euthanized. During this procedure, the animals will remain under continuous (clinical) observation, temperature will be maintained by placing them on warming pads and when needed, fluid infusion will be provided. All procedures on the animals will be performed by our own experienced veterinary team.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

All procedures will be performed under anaesthesia. In the first part animals are euthanized at the end of the procedures, in the second part (pilot) animals will be sedated for i.v. injection and further procedures will be performed 16-20 h later under anaesthesia followed by euthanasia. All procedures are performed under BSL-2 conditions and no adverse effects on the environment are expected.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. 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 H.

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.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In the second part of the study, the animals wake from sedation

Explain why these effects may emerge.

Recovery from sedation can cause confusion, nausea and distress

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

Animals that are sedated and wake up to follow for a further 16-20 h before euthanasia will be closely monitored.

J. 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 K.

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

Indicate the likely incidence.

n.a.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

12 animals non-recovery; 8 animals mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

To isolate the bacteriophages expressing the peptides of interest the brain parenchyma of the animals is needed.

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.

X Yes

Van: 10.2.e [redacted] namens [Info-zbo](#)
Aan: 10.2.e [redacted]
Cc: 10.2.e [redacted]
Onderwerp: Ontvangstbevestiging 10.2.g [redacted] -2
Datum: dinsdag 3 maart 2020 16:37:00
Bijlagen: [Ontvangstbevestiging 10.2.g \[redacted\] -2.pdf](#)
[DEC-advies opgevraagd 10.2.g \[redacted\] -2.pdf](#)

Geachte meneer, mevrouw,

Bijgaand de ontvangstbevestiging van uw wijziging 10.2.g [redacted] -2.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e [redacted]

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g

10.2.e

10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

10.2.g -2

Uw referentie

10.2.g

Bijlagen

1

Datum 3 maart 2020

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Wij hebben op 3 maart 2020 een wijziging ontvangen op uw projectvergunning dierproeven. Het gaat om uw project "Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies" met aanvraagnummer 10.2.g. Uw wijziging is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer 10.2.g -2.

Wacht met het doorvoeren van de wijziging

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 ontvangen. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw wijziging. Als wij nog informatie nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u de wijzigingen doorvoeren in uw project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te betalen, 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.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- Factuur



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g
10.2.e
10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
10.2.g -2

Factuur

Factuurdatum 3 maart 2020
Vervaldatum 2 april 2020
Factuurnummer 10.2.g
Betreft Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

Omschrijving

Bedrag

Betaling leges projectvergunning dierproeven
Betreft aanvraag 10.2.g -2

€ 884,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL 29 INGB 070.50.01.512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93118, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: 10.2.e [redacted] namens Info-zbo
Aan: 10.2.g [redacted]
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag 10.2.g [redacted] -2
Datum: dinsdag 3 maart 2020 16:34:00
Bijlagen: 10.2.g [redacted] [wijziging.pdf.html](#)

Geachte leden van DEC-10.2.g [redacted]

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies"
aanvraagnummer: 10.2.g [redacted] -2

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

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

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

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 3 maart 2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager kan de termijn worden opgeschort. U dient de CCD zo spoedig mogelijk op de hoogte te stellen van deze opschorting. Zodra de opschortende termijn is beëindigd, stelt u de CCD hiervan onverwijld op de hoogte. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt.

Met vriendelijke groeten,

CCD

Van: 10.2.e [redacted] namens [Info-zbo](#)
Aan: [Kasbeheer](#)
Onderwerp: Betaalgegevens 10.2.g [redacted] -2
Datum: dinsdag 3 maart 2020 16:40:00

Er is een nieuwe aanvraag ontvangen. Hiervoor is een factuur verstuurd. Hieronder de gegevens t.b.v. het opboeken van de factuur.

NAW-gegevens:

10.2.g [redacted]
[redacted]
[redacted]

Factuurdatum: 03-03-2020

Factuurnummer: 10.2.g [redacted]

Aanvraagnummer: 10.2.g [redacted] -2

Factuurbedrag: EUR 884,00

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



11

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie
Aanvraagnummer**

10.2.g -2

Datum 3 maart 2020

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 3 maart 2020 hebben wij uw wijziging voor een projectvergunning Dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies" met aanvraagnummer 10.2.g -2.

DEC advies gevraagd

Uw aanvraag is naar DEC 10.2.g gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend

Van: 10.2.e
Aan: [Info-zbo](#)
Onderwerp: amendement aanvraag projectvergunning dierproeven 10.2.g -2
Datum: woensdag 4 maart 2020 09:21:47

Geachte leden van de CCD,

Hierbij bevestig ik de ontvangst van de projectvergunningsaanvraag 10.2.g -2. Wij zullen de aanvraag in behandeling nemen en bespreken in de vergadering van 12 maart 2020.

Vriendelijke groeten,

10.2.e



10.2.g



13

Van: Info-zbo
Aan: 10.2.e
Onderwerp: DEC-advies 10.2.g -2
Datum: donderdag 4 juni 2020 08:36:25

Hoi 10.2.

Er is een nieuw DEC-advies binnen.

Groeten 10.2.

Van: Info-zbo

Verzonden: donderdag 4 juni 2020 08:34

Aan: 10.2.e ; Info-zbo

Onderwerp: RE: advies aanvraag wijziging projectvergunning dierproeven 10.2.g -2

Beste 10.2.

De aangepaste stukken en het advies zijn in goede orde ontvangen. Hartelijk dank hiervoor

Groeten 10.2.e

Van: 10.2.e

Verzonden: woensdag 3 juni 2020 10:58

Aan: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>

Onderwerp: advies aanvraag wijziging projectvergunning dierproeven 10.2.g -2

Geachte leden van de CCD,

Hierbij zend ik u het advies van de 10.2.g betreffende de aanvraag wijziging projectvergunning 10.2.g -2. Tevens zijn bijgesloten die onderdelen van de aanvraag die naar aanleiding van de vragen van de DEC gewijzigd zijn en waar dit advies dus betrekking op heeft.

Vriendelijke groeten,

10.2.e



10.2.g



18

14

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.

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.

Van: Info-zbo
Aan: 10.2.e ; Info-zbo
Onderwerp: RE: advies aanvraag wijziging projectvergunning dierproeven 10.2.g -2
Datum: donderdag 4 juni 2020 08:34:01

Beste 10.2.

De aangepaste stukken en het advies zijn in goede orde ontvangen. Hartelijk dank hiervoor

Groeten 10.2.e

Van: 10.2.e

Verzonden: woensdag 3 juni 2020 10:58

Aan: Info-zbo

Onderwerp: advies aanvraag wijziging projectvergunning dierproeven 10.2.g -2

Geachte leden van de CCD,

Hierbij zend ik u het advies van de 10.2.g betreffende de aanvraag wijziging projectvergunning 10.2.g -2. Tevens zijn bijgesloten die onderdelen van de aanvraag die naar aanleiding van de vragen van de DEC gewijzigd zijn en waar dit advies dus betrekking op heeft.

Vriendelijke groeten,

10.2.e



10.2.g



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.

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 10.2.g [redacted] -2
2. Titel van het project: Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies
3. Titel van de NTS: Identificatie en isolatie van peptiden voor passage door de bloed-hersenbarrière ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen hersenkanker
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer 10.2.g [redacted] -2
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: 10.2.g [redacted]
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.g [redacted]
 - e-mailadres contactpersoon: 10.2.g [redacted]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 04-03-2020
 - aanvraag compleet: 04-03-2020.
 - in vergadering besproken: 12-03-2020
 - anderszins behandeld: 14-05-2020
 - termijnonderbreking(en) van 20-3-2020 tot 14-05-2020 en van 19-05-2020 tot 28-05-2020
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 14-05-2020 en 28-05-2020
 - advies aan CCD: 03-06-2020
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De aanvrager heeft de wijziging afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend bij de CCD.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn

opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrek(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 20-03-2020 en 19-05-2020
 - Gestelde vraag/vragen: Het aan de aanvraag toevoegen van ontbrekende informatie die door de onderzoeker alleen in de begeleidende brief was opgenomen. Vragen omtrent de aard van de te testen compound en experimentele opzet.
 - Datum antwoord: 14-05-2020 en 28-05-2020
 - Verstrek(e) antwoord(en): Nadere informatie werd verstrekt over de aard van de in de wijziging beschreven te testen compound. Het betreft een in eerdere experimenten geïdentificeerd peptide, maar nu gekoppeld aan een IgG hFc construct (peptide-antibody). Daarmee wordt ook duidelijk waarom in de wijziging voor een iets andere proefopzet gekozen wordt dan in de eerdere aanvraag en waarom een controle groep nodig is. Ook is de noodzaak om zowel cerebrospinaal vloeistof af te nemen als het dier te euthanaseren voor analyse van de hersenen nader onderbouwd.
 - De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC). N.v.t.
 - Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een wijziging in bestaande projectvergunning.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise op het gebied van de fysiologie, statistische analyse, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming.
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Er waren geen conflicterende belangen bij de beoordeling van dit voorstel.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De voorgestelde wijziging sluit aan bij de in het project beschreven doelstelling, namelijk het identificeren van stukjes eiwit (peptides) die de bloed-brein barrière (BBB) kunnen passeren. In eerdere experimenten is een veelbelovend peptide gevonden. Bij de eerdere experimenten vormde dit peptide echter een fractie van een zeer diverse pool van peptiden. Bij de huidige wijziging in de aanvraag wordt een volgende stap genomen in de ontwikkeling van een therapeutische compound die de BBB kan passeren door dit peptide te koppelen aan het Fc gedeelte van een humane IgG (peptide-antibody). Door te bestuderen of dit peptide-antibody ook selectief, dus beter dan een controle antibody, de BBB kan passeren worden enerzijds de resultaten uit de eerdere studie met peptide gevalideerd. Anderzijds wordt gekeken of men de peptide-antibody kan terugvinden in zowel het cerebrospinaal vloeistof (CSF) als bij isolatie uit het hele brein. Indien het aantonen van het peptide-antibody in het CSF succesvol is dan zullen in de toekomst geen dieren hoeven te worden geëuthanaseerd om aan te tonen dat een therapeutisch molecuul via de antibody de hersenen heeft bereikt. Het aantal dieren voor deze studie is realistisch in geschat op maximaal 8. Het verwachte ongerief voor de dieren is duidelijk omschreven en de uitkomsten van deze experimenten zijn helder en meetbaar.
2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorie voor deze wijziging, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek', is dezelfde als voor de projectaanvraag.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Het directe doel van deze wijziging is het verifiëren dat een veelbelovend kandidaat peptide-antibody voor transport door de BBB inderdaad ten opzichte van een controle antibody selectieve accumulatie in de hersenen geeft en anderzijds het testen of een dergelijke accumulatie ook kan worden vastgesteld in CSF. Indien dit laatste bereikt wordt dan zal dit leiden tot een grote verfijning in toekomstige experimenten aangezien het doden van het dier dan in veel gevallen niet meer nodig zal zijn. Het uiteindelijke doel is om nieuwe manieren te vinden om therapieën tegen glioblastoma en CNS lymphoma beter de hersenen in te brengen.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*). De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het identificeren van peptiden die het mogelijk maken de bloed-brein barrière te passeren zijn: het onderzoeksveld, de proefdieren en de te genezen personen. Deze zijn reeds eerder in detail beschreven in het advies bij de aanvraag projectvergunning. In aanvulling hierop kunnen de in de wijziging beschreven experimenten leiden tot verfijning van de experimenten. Indien men de gewenste resultaten met de afname van CSF kan bereiken zal het in veel gevallen niet meer nodig zijn om de dieren aan het eind van het experiment te doden.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken? Er zijn geen substantiële milieueffecten te verwachten binnen de kaders of ten gevolge van dit project.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn boven iedere twijfel verheven gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's. De reeds binnen het kader van de projectvergunning uitgevoerde experimenten zijn succesvol verlopen. Er is ervaring binnen het instituut met het afnemen van CSF.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. De DEC is ervan overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. Het in de wijziging beschreven experiment is gebaseerd op de selectie van een veelbelovend kandidaat peptide in eerdere experimenten in makaken uitgevoerd binnen de kaders van deze projectvergunning. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de overeenkomst in structuur en moleculaire samenstelling van de BBB tussen resusapen en mensen.

Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze

minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De huisvesting voldoet geheel aan de richtlijn.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief is correct als licht ingeschat. In tegenstelling tot de eerdere experimenten, waarbij de dieren onder sedatie bleven (non-recovery), zal het dier wel wakker worden na injectie van het te testen peptide-antibody in de bloedbaan. Dit zal echter voor korte duur zijn (14-16 uur), waarna onder sedatie CSF wordt afgenomen en de dieren zullen worden geëthanaseerd.
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de dieren te injecteren met antibody. Na 14-16 uur wordt onder sedatie CSF afgenomen en worden de dieren daarna geperfundeerd met spoelvloeistof waarna ze geëthanaseerd worden.
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe. Dit is een terminaal experiment.
14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. In dit project wordt gezocht naar peptides of de daarop gebaseerde peptide-antibodies die het transport van therapeutisch moleculen (cargo) over de BBB faciliteren. De BBB is nog niet *in vitro* na te bootsen. De beschreven experimenten borduren voort op eerdere resultaten behaald in makaken.
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe. Het aantal benodigde dieren wordt realistisch ingeschat. Er worden twee dieren tegelijk gebruikt voor het te testen kandidaat peptide-antibody en twee dieren voor het controle antibody. Tevens wordt eenzelfde aantal dieren aangevraagd voor het eventueel herhalen van het experiment indien het eerste experiment niet slaagt door onverwachte technische problemen of onduidelijke resultaten.
16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe. Het experiment wordt uitgevoerd onder sedatie. Daarna zullen de dieren nog 14-16 uur in studie blijven, waarna onder sedatie CSF wordt afgenomen, perfusie plaats vindt en de dieren worden geëthanaseerd. Dieren worden gedurende het experiment gemonitord door een ervaren dierenarts. Indien de gewenste resultaten ook verkregen kunnen worden door afname van CSF dan zal dit leiden tot verdere verfijning van toekomstige experimenten, aangezien euthanasie dan niet langer nodig is. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. N.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien

alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. In onderhavige projectaanvraag kunnen dieren van beide geslachten worden gebruikt.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. De dieren worden gedood tijdens de proef. Dit is nodig omdat bepaald moet worden in hoeverre het kandidaat peptide-antibody in vergelijking met een controle antibody selectief de BBB kan passeren. Ook om vast te kunnen stellen of detectie in CSF voldoet dient een vergelijking met de hersenen gemaakt te worden. Dieren worden volgens de richtlijn gedood.
20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. Dieren die in een voorgaand experiment zijn gebruikt kunnen voor dit experiment hergebruikt worden. Echter, aangezien de hersens nodig zijn voor het vervolgtraject, worden de dieren gedurende het experiment gedood.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? Naar de mening van de DEC beschrijft de niet-technische samenvatting het project inhoudelijk correct en in begrijpelijke taal.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het valideren van het vermogen van reeds eerder geselecteerde kandidaat peptiden om na koppeling aan een antibody de BBB te passeren en het testen of CSF gebruikt kan worden als een alternatief voor het vaststellen van BBB penetratie het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen?
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarden. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

De waarden voor het onderzoeksveld is vooral gelegen in de identificatie van peptiden die het mogelijk maken dat therapeutisch moleculen de BBB passeren. De huidige wijziging betreft een vervolgstap in het onderzoek, waarin een uit eerdere studies geselecteerd veelbelovend peptide gekoppeld is aan een antibody en vergeleken wordt met een controle antibody om zodoende het selectief vermogen van de kandidaat peptide-antibody om de BBB te passeren vast te kunnen stellen.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren

handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Onder sedatie wordt het peptide - antibody in de bloedbaan ingespoten. Daarna zullen de dieren nog 14-16 uur in studie blijven, waarna onder sedatie CSF wordt afgenomen, perfusie plaats vindt en de dieren worden geëuthanaseerd. De dieren ondervinden hiervan licht ongerief.

De waarden voor de samenleving is vooral gelegen in de identificatie van peptide-antibodies die het mogelijk maken de BBB te passeren. Als de zoektocht succesvol wordt afgerond en de resultaten extrapoleerbaar zijn naar de mens zal dit breed toepasbaar kunnen worden in de behandeling van verschillende hersenziektes. Dit is echter wel iets dat pas op lange termijn duidelijk zal worden. Daarmee is dit onderzoek van aanmerkelijk belang.

Dit onderzoek kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen verschillende hersenziektes. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De DEC concludeert dat de belangen van het onderzoeksveld en de samenleving die worden nagestreefd in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.

Het onderzoek is op langere termijn van groot belang voor mensen, omdat het dringend nodig is om antikanker medicijnen door de BBB heen te kunnen brengen.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door de veelbelovende resultaten die met muizen en recent ook in makaken zijn behaald. De gekozen strategie voor het valideren van het selectieve vermogen van het kandidaat peptiden-antibodies om de BBB te passeren is overtuigend. Het afnemen van CSF tijdens deze procedure kan belangrijk bijdragen tot verder verfijning van de experimenten. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op fysiologische en moleculaire gelijkenissen tussen mensen en resusapen wat betreft de BBB.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. De experimentele opzet is reeds eerder toegepast in de resusaap binnen dit instituut, met positieve resultaten. Dit onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in de resusaap, aangezien deze dieren meer vergelijkbaar zijn met de mens dan muizen. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoort, de dieren zijn afkomstig uit eigen fok, de 3V-principes worden gehonoreerd door toepassing van sedatie, het voortdurend monitoren van de dieren en hergebruik van dieren. Het ongerief wordt alleen veroorzaakt door de sedatie. De dieren worden gedood aan het einde van het experiment.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt.

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 kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Identificatie en isolatie van peptiden voor passage door de bloed-hersenbarrière ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen hersenkanker
1.2 Looptijd van het project	01-08-2018 tot 31-07-2021
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Peptiden, Bacteriofagen, bloed-hersen barrière, kankertherapie, makaken

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Kwaadaardige tumoren in de hersenen vertegenwoordigen ongeveer 3% van het aantal kankergevallen wereldwijd. Deze kankers geven echter zeer grote problemen in de patiënten en hebben echter een zeer slechte prognose. De meest algemene en dodelijke vorm van hersenkanker is het glioblastoom, met een 5-jaar overleving van slechts 4% in patiënten van middelbare leeftijd. Daarnaast zaaien ook kankers van andere organen zich regelmatig uit naar de hersenen. Op dit moment zijn de behandelmogelijkheden beperkt. Van verschillende specifieke antilichamen is aangetoond dat deze effectief kunnen zijn tegen verschillende kankers. Echter, door de bloed-hersen barrière kunnen
---	---

deze antilichamen niet de hersentumoren bereiken. Daarom zal in dit project onderzoek worden gedaan naar het ontdekken van specifieke stukjes eiwit (peptiden) die binden aan speciale structuren op de bloed-hersenbarrière en deze daarna wel kunnen passeren. Deze peptiden kunnen dan in een vervolgstudie gebonden worden aan antilichamen die op deze manier dan mogelijk wel de bloed-hersenbarrière kunnen passeren en de tumoren bereiken. In muizen is een techniek ontwikkeld waarbij zogenaamde bacteriofagen werden gebruikt die verschillende stukjes eiwit op hun oppervlak hebben. Deze methode resulteerde in de identificatie van eiwitstukjes die de bloed-hersenbarrière bij muizen kunnen passeren. De eigenschappen van de bloed-hersenbarrière van de muis en mens zijn echter beperkt vergelijkbaar. In tegenstelling tot de muis zijn de resusaap en de mens met betrekking tot de bloed-hersenbarrière heel vergelijkbaar. Daarom worden voor deze studie apen gebruikt om de latere kans op slagen bij patiënten zo groot mogelijk te maken. Apen worden hiertoe ingespoten met zogenaamde bacteriofagen die allemaal verschillende eiwitstukjes die mogelijk interessant zijn voor het doel van dit onderzoek op hun oppervlak hebben. De bacteriofagen die de juiste eiwitstukjes hebben om de bloed-hersenbarrière te kunnen passeren kunnen op deze wijze uit de hersenen geïsoleerd worden. Dit moet enkele keren herhaald worden omdat dit om heel kleine aantallen gaat en om alleen de juiste stukken te identificeren en isoleren die later gebruikt kunnen worden voor kankertherapie bij patiënten.

Geschikte kandidaten worden met speciale moleculair-biologische technieken gekoppeld aan een stukje van een humaan antilichaam (IgG). Dit product wordt in een pilotstudie vervolgens ingespoten bij apen om te onderzoeken of dit in voldoende mate de bloed-hersen barrière passeert. Ook zal ruggenmergvloeistof verkregen via een ruggenprik worden genomen om te onderzoeken of dit een bruikbare methode is om de beste kandidaten voor verdere ontwikkeling te selecteren.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Het project zal resulteren in de isolatie en identificatie van specifieke eiwitstukken die de bloed-hersenbarrière kunnen passeren. Dit project vormt de basis voor het ontwikkelen van de nieuwe, beoogde kankertherapie. Bij vervolgonderzoek van het voorgestelde project zullen deze eiwitstukken gebruikt worden om te koppelen aan antilichamen om op termijn mogelijk hersentumoren in patiënten te kunnen behandelen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

20 makaken (Macaca mulatta; Macaca fascicularis)

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Gedurende de studie zijn de dieren onder volledige narcose waarna de dieren direct worden ge-euthanaseerd. Bij selectie van een goede kandidaat zullen maximaal 8 dieren bijkomen uit narcose in hun thuishok waarna de dieren na 16-20 h onder volledige narcose worden ge-euthanaseerd.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

maximaal 12 dieren terminaal (non-recovery), maximaal 8 dieren licht

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Omdat de hersenen nodig zijn worden de dieren ge-euthanaseerd

4 Drie V's

4.1 Vervanging

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Om te bepalen of peptiden de bloed-hersenbarrière kunnen passeren na inspuiten zijn intacte, levende dieren nodig. Er bestaan geen *in vitro* systemen om zowel de binding, transport en verrijking van de peptiden in de hersenen na systemische toediening volledig te onderzoeken. Dit kan deels met behulp van zogenaamde transcytose assays, maar er bestaan momenteel nog geen gevalideerde *in vitro* systemen voor het onderzoek naar transport van grotere stoffen door de bloed-hersenbarrière van primaten (mensen en apen). Er wordt geprobeerd nieuwe muissystemen voor dit type onderzoek op te zetten. Echter, in tegenstelling tot bij de apen, zijn deze op dit moment onvoldoende voorspellend voor de effecten in de mens.

4.2 Vermindering

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Alle methoden en procedures voor de identificatie van de peptiden die de bloed-hersenbarrière kunnen passeren via een specifiek mechanisme zijn eerst onderzocht en geselecteerd met (in zo ver mogelijk) *in vitro* selectiemethoden, zoals binding *in vitro* aan geselecteerde transportmoleculen en *in vivo* in muizenmodellen voordat de stap naar de makaken wordt gemaakt.

4.3 Verfijning

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De studies vinden plaats in makaken. In tegenstelling tot bij andere diersoorten, vertonen de transportmechanismen over de bloed-hersenbarrière **in makaken** de grootste overeenkomsten met die bij de mens. Deze overeenkomst is belangrijk omdat de geselecteerde peptiden gebruikt zullen gaan worden voor het opzetten van nieuwe therapieën tegen hersenkanker bij de mens. De dieren worden gedurende de hele duur van het experiment onder narcose gehouden waardoor ongerief zo veel mogelijk wordt voorkomen.

Als uit deze studie blijkt dat we door het verkrijgen van ruggenmergvloeistof ook kunnen voorspellen hoe goed de passage van de peptiden is door de bloed-hersenbarrière, kunnen verder studies plaatsvinden zonder dat de dieren ge-euthanaseerd hoeven te worden.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De dieren zijn gedurende de gehele procedure onder narcose, waarna euthanasie plaatsvindt. Gedurende de narcose wordt het welzijn van de dieren bewaakt door ervaren dierenartsen.

Dieren die intraveneus een injectie krijgen en 16-20 uur later ge-euthanaseerd worden blijven in hun thuishooi. Anders dan bijkomen uit sedatie worden geen negatieve effecten verwacht en gedurende deze tijd zullen ze geobserveerd worden door de dierversorgers.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.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'.

10.2.g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 Provide the title of the project.

Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

Basic research

Translational or applied research

Regulatory use or routine production

Research into environmental protection in the interest of human or

Research aimed at preserving the species subjected to procedures

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Malignant tumors of the brain and central nervous system (CNS) are relatively rare, representing approximately 3% of new cancer cases estimated worldwide. However, they cause significant morbidity and have a very poor prognosis. The average survival rate in adults with a primary malignant brain tumor is only 34.7%. Glioblastoma is the most common and aggressive malignant brain tumor and the treatment options are very limited (1). The current five-year survival rate is only 4% in patients aged 55-64. In children and adolescents, primary brain tumors are the leading cause of cancer-related death, surpassing leukemia. Additionally, most cancers that arise in other organs of the body have the ability to metastasize to the brain. An estimated 24-45% of all cancer patients have brain metastases, which is associated with poor survival and high morbidity. Consequently, brain cancer remains an area of urgent and unmet medical need.

Antibodies that specifically target certain antigens on tumor cells have proven to be highly effective in the treatment and/or eradication of a variety of highly malignant forms of cancers. However, many potential antibody therapies are not effective in brain cancer, largely because they are unable to cross the blood-brain barrier (BBB) (2). Recently, the collaborating institute has isolated small antibody binding domains (Variable new antigen receptor (VNAR) domains) to specific transporters concentrated in the BBB followed by rapid and robust penetration into the brain of mice using phage display libraries (3). Known transporters of the BBB that can be targeted for this purpose are e.g. transferrin receptors, low-density lipoprotein receptors and leptin receptors (4) VNAR domains are the smallest antibody recognition peptides that can be combined with monospecific antibodies to develop bispecific agents to be transported over the BBB. These peptides are currently studied in order to develop new treatment options for human diseases, including cancer (5,6). Mouse studies have demonstrated that some of these combinations can be readily pulled into the brains of mice. However, there are significant differences in receptor-mediated transport between distantly related species that preclude the direct translation of these mouse studies to humans. Quantitative proteomics studies have shown that there are major differences in the expression of BBB transporters between rodent and human but that the profile is nearly identical between primates (macaque/marmoset/human) (7-10).

There are several systems for the delivery of molecules into the brain that are currently investigated for delivery of molecules into the brain. In contrast to the use of phage libraries displaying VNAR, 2-BBB technology use glutathione PEGylated liposomes to delivery small molecules and is not suitable for the delivery of large molecules. Nanoparticle delivery is another approach being intensively explored but has also yet to achieve successful clinical translation. There are several programs for the development of new platforms to deliver large molecules using a variety of receptor-mediated transport systems but until now these platforms either do not have adequate pharmacokinetic properties or have safety issues that hamper clinical development.

Various in vitro screens have been developed to identify antibodies that bind to receptors. However, there are currently no validated in vitro transcytosis systems for the primate systems available that can predict the different aspects of in vivo binding and transport over the blood-brain barrier. None of the available in vitro methods currently provide antibodies or peptides of sufficient potency or safety for general clinical translation. For instance, many antibodies to the transferrin receptor selected in vitro have adverse effects in vivo because they interfere with function in vivo by either blocking transport of the endogenous ligand or targeting the receptors for lysosomal degradation. In contrast, injection of a VNAR phage display library that was pre-selected on transferrin receptor in vitro resulted in the identification of a highly potent binder that can cross the BBB without competing with transferrin or disrupting the receptor in mice. Using this phage display approach, it has been demonstrated that it is possible to isolate a highly potent and effective carrier for the delivery of large molecules across the BBB in the mouse system. Since there are major differences between the mouse and human BBB and their respective transporter sequences (7-10), the same approach for the identification and isolation of effective peptides (VNAR) that has proven successful in mice will be used in macaques to allow better translation to humans.

The process first involves a selection on purified recombinant receptor protein, to enrich the library with binders to the receptor, covering many different epitopes across the surface. To obtain domains to a

specific transporter, the VNAR phage display library is pre-selected in vitro on selected purified proteins. This pre-selected library, which already has been developed by the collaborators, will be injected into macaques to find the very rare binder that can cross the BBB through an active transport mechanism without disrupting it. Crossing the BBB is a very rare event and since the properties required for this are not known, many different sequences have to be tested. The most efficient way to do this is to test a large phage library containing many possible small antibody binding domains (VNAR) The phage library constructed by the collaborators contains a huge number of these VNAR domains ($>1 \times 10^{10}$) and each has a unique antigen binding sequence.

In the first part of the study, several polypeptides that are good candidates for follow up testing are identified. A promising polypeptide has been cloned into a vector carrying the hFc fragment of IgG. This construct has been expressed and purified and is referred to as antibody. This antibody recognizes and binds with high affinity to recombinant macaque and human Transferrin Receptor 1 (TfR1). It also binds and internalizes with high efficiency to human cerebral microvessel endothelial cells (hCMEC/D3).

Based on those characteristics the antibody is ranked highly for follow up confirmatory brain penetration tests in animals.

1. Sastry RA. et al, 2018. The impact of surgery on survival after progression of glioblastoma: a retrospective cohort analysis of the contemporary patient population. *J. Clin Neurosci* S0967-5868: 31541.
2. Sousa F. et al, 2018. Therapeutic monoclonal antibodies delivery for the glioblastoma treatment. *Adv Protein Chem Struct Biol* 112:61
3. Greenwood J et al, 2017. Current research into brain barriers and the delivery of therapeutics for neurological diseases: a report on CNS barrier congress London, UK, 2017. *Fluids Barriers CNS*, 14:31.
4. Zeiadeh I et al. 2018. Strategies for enhancing the permeation of CNS-active drugs through the blood-brain barrier, a review. *Molecules* 23:1289
5. Könnig D et al. 2017. Semi-synthetic vNAR libraries screened against therapeutic antibodies primarily deliver anti-idiotypic binders. *Sci Rep* 7:9676.
6. Iezzi ME et al. 2018. Single-domain antibodies and the promise of modular targeting in cancer imaging and treatment. *Front Immunol* 9:273.
7. Uchida Y. et al. 2011, Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* 117:333
8. Hoshi Y et al. 2013. Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmosets. *J Pharm Sci* 102:3343.
9. Syvänen S. et al. 2009. Species differences in blood-brain transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metabolism and Disposition* 37:635.
10. Ito K. Et al. 2011. Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci* 100:3939.

3.2 Purpose

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

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

The overall aim is to develop new approaches to combat brain tumours. The brain-penetrating peptides (VNAR) identified and isolated in this project will be linked to therapeutic monoclonal antibodies to transport them into the brain to treat glioblastoma and CNS lymphoma in patients. However, the

approach and its applications are much broader. For example, this same approach can be used to identify peptides to different transporters in the BBB that will have different pharmacology. It is also possible to either genetically or chemically link the delivery peptide with a wide variety of large molecules in addition to monoclonal antibodies, such as enzymes, growth factors, antisense oligonucleotides, toxins and small molecules. These new therapeutic approaches may be useful in a wide range of CNS diseases besides brain cancer, including genetic disorders, neurodegenerative diseases, and CNS autoimmune diseases.

The specific objective of this project is to identify and isolate specific peptides (small antibody binding domains, so called VNAR) that are able to cross the BBB through a specific receptor-mediated transport mechanism in vivo in primates using a phage library expressing a large range of different VNAR. The phage library has been constructed by the collaborating partner and is available. The method that will be used for identification and isolation of the VNAR has been developed and used in mice by the partner. This project is a collaboration with the experts in the construction of above-mentioned products and experts in non-human primate research, which makes the project very likely to succeed.

3.3 Relevance

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

This project concerns applied, translational research on development of new tools to combat brain diseases, e.g. brain tumours. There are currently limited treatment possibilities for these devastating cancers and new treatment possibilities are therefore of major social importance. This project will be instrumental to identify and isolate small antibody binding domains (VNAR) that readily bind to receptors of the BBB and penetrate the brain without toxicity or influencing receptor activity. The VNAR identified in this project will subsequently be used to fuse them with monoclonal antibodies for future clinical research.

3.4 Research strategy

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

The overall strategy is to develop a brain delivery system using small antibody binding domains with the most potent activity that are optimized for the BBB transport system of primates. Peptides that bind a specific transport receptor are displayed on the surface of phage particles. This phage library expressing a large variety of VNAR is injected intravenously under full anaesthesia and the particles are allowed to circulate throughout the body for 2 to maximally 3 h hours. During this time, bacteriophages that display the correct VNAR will bind to receptors on the BBB and some of them will penetrate the brain parenchyma. The animals will remain under anaesthesia during the whole procedure. Anaesthesia has no effect on the binding and penetration of the VNAR-expressing bacteriophages. While still under anaesthesia the animals will be perfused to remove bacteriophages from the blood vessels and the animal will be euthanized. The brain is removed and fractionated to recover the phage particles from the brain parenchyma. The recovered bacteriophages are amplified in bacterial culture in vitro and purified to remove contaminants. Next, the recovered bacteriophage cultures are injected into other animals and the same procedures as described above will be performed. The starting library has only very few phages carrying a specific sequence that will bind to specific receptors and translocate into the brain. Once injected into the animal, most non-binding particles are rapidly cleared. The only way to detect whether a useful VNAR is correctly identified, is to re-inject more copies and determine if there is a corresponding increase in the number found in the brain. Two repeats of injection (in total three rounds) are the bare minimum required to detect a clear result regarding receptor binding and to obtain sufficient material for further analysis. This method targeting specific 'address codes' on the endothelium of particular organs using phage display peptide libraries was first described in 1996 by Pasqualini & Ruoslahti (*Nature* 380(6572):364-6). This has been successfully adapted for crossing of the capillary endothelium of the BBB.

The platform and procedures that have been developed were highly successful in mice and can be directly applied to non-human primates with only minor modifications. It is likely that the same approach will be

successful in primates for several reasons: 1) primate and mice use the same transporter systems to carry essential nutrients into the brain despite variations in their receptors; 2) pre-selected phage libraries that contain large numbers of unique peptide sequences to many different points on receptor are already prepared by the collaborating party; and 3) by performing various repeats of selection *in vivo*, binders that are the most functionally important and tailored to the BBB transport system of primates can be isolated. This project is a collaboration with the experts in the construction of above-mentioned products and experts in non-human primate research.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

The major aim is specific enrichment of bacteriophages to identify binding peptides of the BBB for later development of novel treatments for brain tumours. The project consists of repeated passage of the isolated bacteriophages in non-human primates in order to enrich the population that recognizes the specific receptors in the primate BBB transport system. The selection of leads for further characterization and development is determined by the copy number of each peptide sequence found in the brain parenchyma after each round of injecting the mixture. The leads with the best biophysical properties and brain uptake will be used to produce bi-specific delivery peptide-antibody products for targeting brain tumours (not included in this project)

After a first selection of a promising polypeptide-bacteriophage for brain penetration, the polypeptide is cloned into a vector carrying the hFc IgG fragment. This is the next step in the development of new compounds for brain tumors. We will test the brain delivery of this antibody in comparison to negative control antibody, which was selected based on no brain penetration in mice. Animals will be injected intravenously and after 16-20 h sedated for collection of CSF and blood followed by euthanasia and isolation of the brain. These data will be used to evaluate if CSF is suitable to be used as a brain surrogate for future work and testing of alternative antibodies without the need of sacrificing the animals.

The ultimate aim is to identify new compounds that pass the BBB and can be used for further development of novel treatments for brain tumours.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

In the first part of the study bacteriophage pools are passed in different macaques three times. If enrichment of the pools results in the selection of an interesting polypeptide, this will be used in a pilot study to determine if for further selection CSF can be used as brain surrogate to prevent euthanasia of animals for further selection of interesting compounds.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

9

10

Wij hebben nu Y niet, het is een belangrijk onderdeel van de
organisatie van de organisatie. Het is een belangrijk onderdeel van de
organisatie en het is een belangrijk onderdeel van de organisatie. Het
is een belangrijk onderdeel van de organisatie. Het is een belangrijk
onderdeel van de organisatie. Het is een belangrijk onderdeel van de
organisatie. Het is een belangrijk onderdeel van de organisatie.

De organisatie van de organisatie is een belangrijk onderdeel van de
organisatie. Het is een belangrijk onderdeel van de organisatie. Het
is een belangrijk onderdeel van de organisatie. Het is een belangrijk
onderdeel van de organisatie. Het is een belangrijk onderdeel van de
organisatie. Het is een belangrijk onderdeel van de organisatie.

De organisatie van de organisatie is een belangrijk onderdeel van de
organisatie. Het is een belangrijk onderdeel van de organisatie. Het
is een belangrijk onderdeel van de organisatie. Het is een belangrijk
onderdeel van de organisatie. Het is een belangrijk onderdeel van de
organisatie. Het is een belangrijk onderdeel van de organisatie.

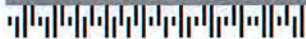


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g

10.2.e

10.2.g



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
10.2.g -2
Bijlagen
2

Datum 6 juli 2020
Betreft Ontvangstbevestiging Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Wij hebben op 3 maart 2020 een wijziging ontvangen op uw projectvergunning dierproeven. Het gaat om uw project "Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies " met aanvraagnummer 10.2.g, waarvoor op een vergunning is afgegeven. Uw wijziging is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer 10.2.g -2.

Wacht met de uitvoering van uw wijziging

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw wijziging 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 wijziging. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. Als u goedkeuring krijgt op uw wijziging, kunt u daarna de wijzigingen doorvoeren in uw 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 wijziging in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw wijziging buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw wijziging niet beoordeeld wordt en u de wijzigingen niet mag doorvoeren in uw project.

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: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:
6 juli 2020
Aanvraagnummer:
10.2.g -2

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

10.2.g

Deelnemersnummer NVWA:

Naam instelling of organisatie:

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

10.2.e

Straat en huisnummer:

10.2.g

Postbus:

Postcode en plaats:

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

10.2.e

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

10.2.e

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag

Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve
gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

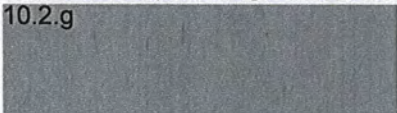
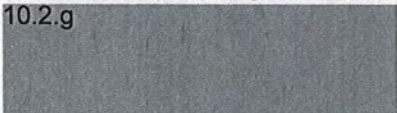
Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve
gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Het vergunde

aanvraagnummer:

10.2.g

Over uw project

Geplande startdatum: 1 augustus 2018
Geplande einddatum: 31 juli 2021
Titel project: Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies
Titel niet-technische samenvatting: Identificatie en isolatie van peptiden voor passage door de bloed-hersenbarrière ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen hersenkanker
Naam DEC: 10.2.g
Postadres DEC: 
E-mailadres DEC: 

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 884,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: 10.2.e
Functie: 
Plaats: 10.2.g
Datum: 21 februari 2020



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g
10.2.e
10.2.g


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
10.2.g -2
Bijlagen
2

Datum 6 juli 2020
Betreft Factuur wijziging projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 6 juli 2020
Vervaldatum: 5 augustus 2020
Factuurnummer: 10.2.g

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft wijziging 10.2.g -2	€ 884,00

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, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



Advies aan CCD

B

Datum 07 juli 2020
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven 10.2.g -2

Instelling: 10.2.g
Onderzoeker: 10.2.e
Project: Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies
Betreft: Wijziging
Categorieën: Translatieel of toegepast onderzoek

1

Voor aanvraag 10.2.g is een wijzigingsaanvraag ingediend. Deze is geregistreerd als 10.2.g -2. Het project is getiteld: Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies .

<p>Proces</p>	<p>Het Secretariaat stelt voor om de volgende vragen te stellen:</p> <ul style="list-style-type: none"> - In uw wijzigingsaanvraag vraagt u 8 extra dieren aan, waarvan 4 dieren zijn voor een eventuele herhaling van de proef in het geval van onverwacht technisch falen of tegenstrijdige resultaten. In onze ogen is de noodzaak van deze extra dieren hiermee echter nog onvoldoende onderbouwd. Zo blijkt uit de aanvraag niet welke vormen van technisch falen kunnen leiden tot het mislukken van de proef en wat de criteria zijn voor tegenstrijdige resultaten die de herhaling van de proef zouden rechtvaardigen. Tot slot vragen wij ons af of het niet mogelijk is om de noodzaak voor het gebruik van deze 'reservedieren' niet voorkomen kan worden door het treffen zorgvuldige voorzorgsmaatregelen. Wij zouden op deze punten graag extra toelichting en onderbouwing van u ontvangen. - Het ongerief in verband met de extra proeven zal toenemen van terminaal naar licht, omdat de dieren tussen de injectie van de compound en het moment dat ze geëthanaseerd worden weer bij bewustzijn komen. volgens de wet op de dierproeven is het verplicht om het ongerief voor de proefdieren zoveel mogelijk te beperken. Het is bij mensen in de kliniek niet ongehoord om patiënten voor langere perioden (dagen) onder narcose te brengen. Wij vragen ons af of 11.1 [redacted]. Wij horen graag wat uw gedachten hierover zijn en of u deze optie hebt overwogen.
<p>Inhoud wijziging</p>	<p>Om te bestuderen of een in dit project geïdentificeerde veelbelovende polypeptide-bacteriophage voor het over de bloed-hersen barrière (BBB) transporteren van behandelingen voor herentumoren. Onderzocht wordt of de geïdentificeerde polypeptide-bacteriophage beter dan een controle antibody, de BBB kan passeren. Hiervoor worden enerzijds de resultaten uit de eerdere studie met peptide gevalideerd. Anderzijds wordt gekeken of men de peptide-antibody kan terugvinden in zowel het cerebrospinaal vloeistof (CSF) als bij isolatie uit het hele brein.</p> <p>Hiervoor zullen 8 extra makaken aan bijlage 3.4.4.1 worden toegevoegd. Deze extra dieren zullen licht ongerief ondervinden, terwijl de 12 origineel vergunde dieren enkel terminaal ongerief ervaren. Dit komt doordat de extra omdat 1x extra onder narcose worden gebracht.</p>

<p>Reden wijziging</p>	<p>Citaat begeleidende brief:</p> <p>The goal of the study is to identify peptides (small antibodies) that are able to cross the blood-brain barrier (BBB) through a specific receptor-mediated transport mechanism and ultimately be later used to deliver functional therapeutic payloads specifically to the brain. As described in the original study proposal, we used a method that has been successful in mice. In the study described under the original approval 10.2.g [REDACTED] it has been possible to identify an antibody that is a good candidate for follow up testing (further called compound). This compound recognizes and binds with high affinity to recombinant macaque and human Transferrin Receptor 1 (TfR1). It also binds and internalizes with high efficiency to human cerebral microvessel endothelial cells (hCMEC/D3).</p> <p>Based on those characteristics the compound is ranked highly for follow up confirmatory brain penetration tests in animals. To proceed this compound and in addition test if CSF can be used as predictor of brain enrichment of selected compounds, we propose a pilot to test the compound's brain delivery in comparison to a selected negative control antibody. In addition to the brain sampling, we will also collect CSF, which will be evaluated for its suitability to be used as a brain surrogate for future work and testing of alternative, promising antibodies without the need of sacrificing the animals. When successful, we will include this in a new application for further testing.</p>
-------------------------------	---

2
 Ingediende meldingen en wijzigingen

Nr.	Datum	Omschrijving
1	04-11-2019	<i>Melding Citaat:</i> Onder projectvergunning 10.2.g hebben we toestemming om ten behoeve van de ontwikkeling van nieuwe therapie tegen hersentumoren 12 resus makaken te gebruiken. Dit betreft een studie onder terminale sedatie (non-recovery). Hiervoor worden dieren geselecteerd die al eerder in een studie zijn geweest met maximaal matig ongerief of dieren die om ethische of veterinaire redenen ge-euthanaseerd zullen gaan worden. Op dit moment hebben we 6 Java apen die voldoen aan de laatste eisen. Deze dieren zijn wat betreft onze vraagstelling identiek aan resus apen. Daarom is besloten dat we in plaats van resus apen, 6 Java apen gebruiken voor dit project. Dit is voorgelegd aan de IvD van de instantie. Er zijn geen veranderingen in vraagstelling, herkomst en huisvesting dieren, dierhandelingen, ongerief en aantal dieren.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	12 / 20	100,0% Terminaal / 60,0% Terminaal 40,0% Licht

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

Het betreft onderzoek in niet-menselijke primaten die mogelijk worden hergebruikt uit eerdere projecten.

Locatie uitvoering experimenten	
Maatschappij	Er wordt verwacht dat het onderwerp in die mate politiek of maatschappelijk gevoelig is, dat eventuele extra communicatie uitingen nodig zijn. Het betreft onderzoek in niet-menselijke primaten (10e). Dieren zullen gedood worden aan het einde van de proef.

3

Beoordeling wijziging door DEC

DECadvis**Citaat C1. (samenhang)**

De voorgestelde wijziging sluit aan bij de in het project beschreven doelstelling, namelijk het identificeren van stukjes eiwit (peptides) die de bloed-brein barrière (BBB) kunnen passeren. In eerdere experimenten is een veelbelovend peptide gevonden. Bij de eerdere experimenten vormde dit peptide echter een fractie van een zeer diverse pool van peptiden. Bij de huidige wijziging in de aanvraag wordt een volgende stap genomen in de ontwikkeling van een therapeutische compound die de BBB kan passeren door dit peptide te koppelen aan het Fc gedeelte van een humane IgG (peptide-antibody). Door te bestuderen of dit peptide-antibody ook selectief, dus beter dan een controle antibody, de BBB kan passeren worden enerzijds de resultaten uit de eerdere studie met peptide gevalideerd. Anderzijds wordt gekeken of men de peptide-antibody kan terugvinden in zowel het cerebrospinaal vloeistof (CSF) als bij isolatie uit het hele brein. Indien het aantonen van het peptide-antibody in het CSF succesvol is dan zullen in de toekomst geen dieren hoeven te worden geëuthanaseerd om aan te tonen dat een therapeutisch molecuul via de antibody de hersenen heeft bereikt. Het aantal dieren voor deze studie is realistisch in geschat op maximaal 8. Het verwachte ongerief voor de dieren is duidelijk omschreven en de uitkomsten van deze experimenten zijn helder en meetbaar.

Citaat C9. (bijzondere categorieën):**Niet-menselijke primaten (10e)**

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de overeenkomst in structuur en moleculaire samenstelling van de BBB tussen resusapen en mensen.

Hergebruik (1e, lid 2)

Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

Citaat C14. (vervanging):

In dit project wordt gezocht naar peptides of de daarop gebaseerde peptide-antibodies die het transport van therapeutisch moleculen (cargo) over de BBB faciliteren. De BBB is nog niet in vitro na te bootsen. De beschreven experimenten borduren voort op eerdere resultaten behaald in makaken.

Citaat C15 (vermindering):

Het aantal benodigde dieren wordt realistisch ingeschat. Er worden twee dieren tegelijk gebruikt voor het te testen kandidaat peptide-antibody en twee dieren voor het controle antibody. Tevens wordt eenzelfde aantal

dieren aangevraagd voor het eventueel herhalen van het experiment indien het eerste experiment niet slaagt door onverwachte technische problemen of onduidelijke resultaten.

Citaat C16 (verfijning):

Het experiment wordt uitgevoerd onder sedatie. Daarna zullen de dieren nog 14-16 uur in studie blijven, waarna onder sedatie CSF wordt afgenomen, perfusie plaats vindt en de dieren worden geëuthanaseerd. Dieren worden gedurende het experiment gemonitord door een ervaren dierenarts. Indien de gewenste resultaten ook verkregen kunnen worden door afname van CSF dan zal dit leiden tot verdere verfijning van toekomstige experimenten, aangezien euthanasie dan niet langer nodig is. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Citaat C19. (doden):

De dieren worden gedood tijdens de proef. Dit is nodig omdat bepaald moet worden in hoeverre het kandidaat peptide-antibody in vergelijking met een controle antibody selectief de BBB kan passeren. Ook om vast te kunnen stellen of detectie in CSF voldoet dient een vergelijking met de hersenen gemaakt te worden. Dieren worden volgens de richtlijn gedood.

Citaat C20. (herplaatsing):

Dieren die in een voorgaand experiment zijn gebruikt kunnen voor dit experiment hergebruikt worden. Echter, aangezien de hersens nodig zijn voor het vervolgtraject, worden de dieren gedurende het experiment gedood.

Ethische afweging van de DEC:

1. Rechtvaardigt het valideren van het vermogen van reeds eerder geselecteerde kandidaat peptiden om na koppeling aan een antibody de BBB te passeren en het testen of CSF gebruikt kan worden als een alternatief voor het vaststellen van BBB penetratie het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen?

2. De waarden voor het onderzoeksveld is vooral gelegen in de identificatie van peptiden die het mogelijk maken dat therapeutisch moleculen de BBB passeren. De huidige wijziging betreft een vervolgstap in het onderzoek, waarin een uit eerdere studies geselecteerd veelbelovend peptide gekoppeld is aan een antibody en vergeleken wordt met een controle antibody om zodoende het selectief vermogen van de

kandidaat peptide-antibody om de BBB te passeren vast te kunnen stellen.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Onder sedatie wordt het peptide -antibody in de bloedbaan ingespoten. Daarna zullen de dieren nog 14-16 uur in studie blijven, waarna onder sedatie CSF wordt afgenomen, perfusie plaats vindt en de dieren worden geëuthanaseerd. De dieren ondervinden hiervan licht ongerief.

De waarden voor de samenleving is vooral gelegen in de identificatie van peptide-antibodies die het mogelijk maken de BBB te passeren. Als de zoektocht succesvol wordt afgerond en de resultaten extrapoleerbaar zijn naar de mens zal dit breed toepasbaar kunnen worden in de behandeling van verschillende hersenziektes. Dit is echter wel iets dat pas op lange termijn duidelijk zal worden. Daarmee is dit onderzoek van aanmerkelijk belang.

Dit onderzoek kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen verschillende hersenziektes. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

3. De DEC concludeert dat de belangen van het onderzoeksveld en de samenleving die worden nagestreefd in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.

Het onderzoek is op langere termijn van groot belang voor mensen, omdat het dringend nodig is om antikanker medicijnen door de BBB heen te kunnen brengen.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door de veelbelovende resultaten die met muizen en recent ook in makaken zijn behaald. De gekozen strategie voor het valideren van het selectieve vermogen van het kandidaat peptiden-antibodies om de BBB te passeren is overtuigend. Het afnemen van CSF tijdens deze procedure kan belangrijk bijdragen tot verder verfijning van de experimenten. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op fysiologische en moleculaire gelijkenissen tussen mensen en resusapen wat betreft de BBB.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. De experimentele opzet is reeds eerder toegepast in de resusaap binnen dit instituut, met positieve resultaten. Dit onderzoek kan

alleen worden uitgevoerd in de resusaap, aangezien deze dieren meer vergelijkbaar zijn met de mens dan muizen. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoort, de dieren zijn afkomstig uit eigen fok, de 3V-principes worden gehonoreerd door toepassing van sedatie, het voortdurend monitoren van de dieren en hergebruik van dieren. Het ongerief wordt alleen veroorzaakt door de sedatie. De dieren worden gedood aan het einde van het experiment.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

4 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

Onder C13 schrijft u dat het een terminaal experiment betreft, wat het ontbreken van humane eindpunten zou valideren. Dit is echter technisch gezien onjuist, de dieren zullen weer uit narcose ontwaken voordat de de proef ten einde loopt. Wij zijn het overigens eens met uw oordeel dat humane eindpunten niet noodzakelijk zijn gezien de aard van de handelingen.
--

5 Inhoudelijke beoordeling

Hergebruik

Er is sprake van hergebruik van dieren.

3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides: CITAAT: Additional, animals from previous studies can be used as long as prior treatments did not affect the BBB integrity.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides	Ja	volgens de richtlijn.

6 Samenvatting

De wijzigingsaanvraag 11.1

[Redacted text]

In de ogen van het Secretariaat 11.1

[Redacted text]

Het Secretariaat 11.1

[Redacted text]

7 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat 11.1

[Redacted text]

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2022 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

8 Concept beschikking voor akkoord CCD

Van: 10.2.e
Aan:
Onderwerp: Re: 2e beoordeling 10.2.g -2
Datum: dinsdag 7 juli 2020 11:40:27

23

Ik ga em aansluitend op het clusteroverleg doen. Is dat oké?

Op 7 jul. 2020 om 11:35 heeft 10.2.e het volgende geschreven:

22

10.2.e

Hoi

DEze is klaar voor de 2^e beoordeling. Ik wil 11.1

Ben jij het hiermee

eens?

T:\RVO\Kluis_OBDA\3_CCD\3.2_Bestuurstukken\Conceptadviezen en andere 10.2.e en

10.2.g

Groet!

10.2.e

Van: info@zbo-ccd.nl
Aan: 10.2.e
Cc:
Onderwerp: Aanhouden 10.2.g -2
Datum: maandag 13 juli 2020 11:34:37

Geachte 10.2.e

Op 03-03-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies " met aanvraagnummer 10.2.g -2. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

- In uw wijzigingsaanvraag vraagt u 8 extra dieren aan, waarvan 4 dieren voor een eventuele herhaling van de proef in het geval van onverwacht technisch falen of tegenstrijdige resultaten. In onze ogen is de noodzaak van deze extra dieren echter onvoldoende onderbouwd. Zo blijkt uit de aanvraag niet welke vormen van technisch falen kunnen leiden tot het mislukken van de proef en vragen wij ons af of het niet mogelijk is om de noodzaak voor het gebruik van 'reservedieren' niet voorkomen kan worden door het treffen zorgvuldige voorzorgsmaatregelen. Ook is niet duidelijk in wat u verstaat onder tegenstrijdige resultaten en waarom deze een eventuele herhaling van de proef zouden rechtvaardigen. Wij zouden op deze punten graag extra toelichting en onderbouwing van u ontvangen.

- Het ongerief in verband met de extra proeven zal toenemen van minimaal naar licht, omdat de dieren tussen de injectie van de compound en het moment dat ze geëthanaseerd worden weer bij bewustzijn komen. Volgens de wet op de dierproeven is het verplicht om dierproeven op de meest verfijnde manier uit te voeren en het ongerief voor de dieren zoveel mogelijk te beperken. Wij vragen ons daarom af hoe stressvol het voor de dieren is om in korte tijd 2x onder narcose te worden gebracht en of het eventueel minder ongerief op zou leveren als de dieren gedurende het gehele experiment onder narcose worden gehouden. Wij horen graag wat uw gedachten hierover.

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 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: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Van: 10.2.e [redacted] namens Info-zbo
Aan: 10.2.g [redacted]
Onderwerp: FW: Aanhouden 10.2.g [redacted] -2
Datum: maandag 13 juli 2020 11:42:25

Geachte 10.2.g [redacted]

De bovenstaande aanvraag is aangehouden. Ter informatie stuur ik u bij deze de vragen die gesteld zijn aan de aanvrager.

Met vriendelijke groet,

10.2.e [redacted]

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0900-2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: info@zbo-ccd.nl

Verzonden: maandag 13 juli 2020 11:35

Aan: 10.2.e [redacted]

CC: 10.2.e [redacted]

Onderwerp: Aanhouden 10.2.g [redacted] -2

Geachte 10.2.e [redacted]

Op 03-03-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies " met aanvraagnummer 10.2.g [redacted] -2. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

- In uw wijzigingsaanvraag vraagt u 8 extra dieren aan, waarvan 4 dieren voor een eventuele herhaling van de proef in het geval van onverwacht technisch falen of tegenstrijdige resultaten. In onze ogen is de noodzaak van deze extra dieren echter onvoldoende onderbouwd. Zo blijkt uit de aanvraag niet welke vormen van technisch falen kunnen leiden tot het mislukken van de proef en vragen wij ons af of het niet mogelijk is om de noodzaak voor het gebruik van 'reservedieren' niet voorkomen kan worden door het treffen zorgvuldige voorzorgsmaatregelen. Ook is niet duidelijk in wat u verstaat onder tegenstrijdige resultaten en waarom deze een eventuele herhaling van de proef zouden rechtvaardigen. Wij zouden op deze punten graag extra toelichting en onderbouwing van u ontvangen.

- Het ongerief in verband met de extra proeven zal toenemen van minimaal naar licht, omdat de dieren tussen de injectie van de compound en het moment dat ze geëthanaseerd worden weer bij bewustzijn komen. Volgens de wet op de dierproeven is het verplicht om dierproeven op de meest verfijnde manier uit te voeren en het ongerief voor de dieren zoveel mogelijk te beperken. Wij vragen ons daarom af hoe stressvol het voor de dieren is om in korte tijd 2x onder narcose te

worden gebracht en of het eventueel minder ongerief op zou leveren als de dieren gedurende het gehele experiment onder narcose worden gehouden. Wij horen graag wat uw gedachten hierover.

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 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: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Betreft: Aanvullende informatie n.a.v. vragen over 10.2.g -2 "Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies "

Geachte leden van de CCD,

Hierbij de aanvullende informatie met betrekking tot uw vragen over 10.2.g -2. De vragen van de CCD zijn toegevoegd in italics.

- In uw wijzigingsaanvraag vraagt u 8 extra dieren aan, waarvan 4 dieren voor een eventuele herhaling van de proef in het geval van onverwacht technisch falen of tegenstrijdige resultaten. In onze ogen is de noodzaak van deze extra dieren echter onvoldoende onderbouwd. Zo blijkt uit de aanvraag niet welke vormen van technisch falen kunnen leiden tot het mislukken van de proef en vragen wij ons af of het niet mogelijk is om de noodzaak voor het gebruik van 'reservedieren' niet voorkomen kan worden door het treffen zorgvuldige voorzorgsmaatregelen. Ook is niet duidelijk in wat u verstaat onder tegenstrijdige resultaten en waarom deze een eventuele herhaling van de proef zouden rechtvaardigen. Wij zouden op deze punten graag extra toelichting en onderbouwing van u ontvangen.

We zijn het met u eens dat de 4 extra dieren voor een eventuele herhaling in geval van technisch falen of tegenstrijdige resultaten niet voldoende onderbouwd is. De kans op het nodig zijn van deze 4 additionele dieren is erg klein omdat we al goede protocollen en de nodige ervaring hebben met de handelingen. We hebben de ervaring dat in een enkel geval de perfusie ondanks een gevalideerd standaard protocol om onbekende redenen niet volledig is waardoor de analyse niet meer mogelijk is. Dit is echter zeldzaam en zal nooit 4 dieren betreffen. Daarom stellen we voor om alleen voor het zeldzame geval van een mislukte perfusie 1 extra dier (in plaats van 4) voor een eventuele vervanging op te nemen in het protocol. Indien we dit dier nodig hebben zal dat alleen gebeuren na overleg en akkoord van de IvD. De aanvraag projectvergunning is hierop aangepast en wordt meegestuurd.

-Het ongerief in verband met de extra proeven zal toenemen van minimaal naar licht, omdat de dieren tussen de injectie van de compound en het moment dat ze geëuthanaseerd worden weer bij bewustzijn komen. Volgens de wet op de dierproeven is het verplicht om dierproeven op de meest verfijnde manier uit te voeren en het ongerief voor de dieren zoveel mogelijk te beperken. Wij vragen ons daarom af hoe stressvol het voor de dieren is om in korte tijd 2x onder narcose te worden gebracht en of het eventueel minder ongerief op zou leveren als de dieren gedurende het gehele experiment onder narcose worden gehouden. Wij horen graag wat uw gedachten hierover.

We zijn ons er zeker van bewust dat iedere handeling aan een dier een bepaalde mate van ongerief veroorzaakt. Daarom zijn onze dieren getraind om zo veel mogelijk aan specifieke handelingen, zoals het krijgen van een sedatie, gewend te raken om op deze wijze stress zo veel mogelijk te voorkomen en te minimaliseren. In dit specifieke geval krijgen de dieren een kortdurende sedatie en komen ze bij in de thuiskooi samen met de kooigenoten. Omdat de dieren ook minimaal 1x per jaar een veterinaire gezondheidscontrole ondergaan zijn ze hiermee bekend. Na de tweede sedatie en diepe narcose komen ze niet meer bij. Wij hebben overwogen om de dieren gedurende de gehele periode van 16-20 uur onder narcose te houden en ook de DEC heeft hier in hun behandeling een vraag over gesteld. De mogelijkheid voor de lange narcose is eerder overlegd met ons veterinaire team (3 NHP-gespecialiseerde dierenartsen). In principe is langdurige narcose mogelijk. De dierenartsen hebben aangegeven dat er ondanks alle voorzorgsmaatregelen wel een geringe kans is op negatieve effecten

van deze langdurige narcose zoals een verstoorde bloedcirculatie en mogelijk temperatuur-gerelateerde effecten. Het is onzeker of deze effecten een negatief effect zullen hebben op de studie, met name op de interactie van de compound met de bloed-hersen barrière en op de perfusie van de hersenen. Gezien deze onzekerheid als we de dieren onder langdurige narcose houden willen we de opzet zoals oorspronkelijk beschreven handhaven.

Met Vriendelijke Groet,

10.2.e



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project Identificatie en isolatie van peptiden voor passage door de bloed-hersenbarrière ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen hersenkanker
- 1.2 Looptijd van het project 01-08-2018 tot 31-07-2021
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) Peptiden, Bacteriofagen, bloed-hersen barrière, kankertherapie, makaken

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project. Fundamenteel onderzoek
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.* Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) Kwaadaardige tumoren in de hersenen vertegenwoordigen ongeveer 3% van het aantal kankergevallen wereldwijd. Deze kankers geven echter zeer grote problemen in de patiënten en hebben ~~echter~~ een zeer slechte prognose. De meest algemene en dodelijke vorm van hersenkanker is het glioblastoom, met een 5-jaar overleving van slechts 4% in patiënten van middelbare leeftijd. Daarnaast zaaien ook kankers van andere organen zich regelmatig uit naar de hersenen. Op dit moment zijn de behandelingsmogelijkheden beperkt. Van verschillende specifieke antilichamen is aangetoond dat deze effectief kunnen zijn tegen verschillende kankers. Echter, door de bloed-hersen barrière kunnen

deze antilichamen niet de hersentumoren bereiken. Daarom zal in dit project onderzoek worden gedaan naar het ontdekken van specifieke stukjes eiwit (peptiden) die binden aan speciale structuren op de bloed-hersenbarrière en deze daarna wel kunnen passeren. Deze peptiden kunnen dan in een vervolgstudie gebonden worden aan antilichamen die op deze manier dan mogelijk wel de bloed-hersenbarrière kunnen passeren en de tumoren bereiken. In muizen is een techniek ontwikkeld waarbij zogenaamde bacteriofagen werden gebruikt die verschillende stukjes eiwit op hun oppervlak hebben. Deze methode resulteerde in de identificatie van eiwitstukjes die de bloed-hersenbarrière bij muizen kunnen passeren. De eigenschappen van de bloed-hersenbarrière van de muis en mens zijn echter beperkt vergelijkbaar. In tegenstelling tot de muis zijn de resusaap en de mens met betrekking tot de bloed-hersenbarrière heel vergelijkbaar. Daarom worden voor deze studie apen gebruikt om de latere kans op slagen bij patiënten zo groot mogelijk te maken. Apen worden hiertoe ingespoten met zogenaamde bacteriofagen die allemaal verschillende eiwitstukjes die mogelijk interessant zijn voor het doel van dit onderzoek op hun oppervlak hebben. De bacteriofagen die de juiste eiwitstukjes hebben om de bloed-hersenbarrière te kunnen passeren kunnen op deze wijze uit de hersenen geïsoleerd worden. Dit moet enkele keren herhaald worden omdat dit om heel kleine aantallen gaat en om alleen de juiste stukken te identificeren en isoleren die later gebruikt kunnen worden voor kankertherapie bij patiënten.

Geschikte kandidaten worden met speciale moleculair-biologische technieken gekoppeld aan een stukje van een humaan antilichaam (IgG). Dit product wordt in een pilotstudie vervolgens ingespoten bij apen om te onderzoeken of dit in voldoende mate de bloed-hersen barrière passeert. Ook zal ruggenmergvloeistof verkregen via een ruggenprik worden genomen om te onderzoeken of dit een bruikbare methode is om de beste kandidaten voor verdere ontwikkeling te selecteren.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Het project zal resulteren in de isolatie en identificatie van specifieke eiwitstukken die de bloed-hersenbarrière kunnen passeren. Dit project vormt de basis voor het ontwikkelen van de nieuwe, beoogde kankertherapie. Bij vervolgonderzoek van het voorgestelde project zullen deze eiwitstukken gebruikt worden om te koppelen aan antilichamen om op termijn mogelijk hersentumoren in patiënten te kunnen behandelen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

17 makaken (*Macaca mulatta*; *Macaca fascicularis*)

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Gedurende de studie zijn de dieren onder volledige narcose waarna de dieren direct worden ge-euthanaseerd. Bij selectie van een goede kandidaat zullen maximaal 5 dieren bijkomen uit narcose in hun thuishooi waarna de dieren na 16-20 h onder volledige narcose worden ge-euthanaseerd.

- | | |
|---|--|
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | maximaal 12 dieren terminaal (non-recovery), maximaal 5 dieren licht |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Omdat de hersenen nodig zijn worden de dieren ge-euthanaseerd |

4 Drie V's

- | | |
|--|--|
| <p>4.1 Vervanging
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.</p> | <p>Om te bepalen of peptiden de bloed-hersenbarrière kunnen passeren na inspuiten zijn intacte, levende dieren nodig. Er bestaan geen <i>in vitro</i> systemen om zowel de binding, transport en verrijking van de peptiden in de hersenen na systemische toediening volledig te onderzoeken. Dit kan deels met behulp van zogenaamde transcytose assays, maar er bestaan momenteel nog geen gevalideerde <i>in vitro</i> systemen voor het onderzoek naar transport van grotere stoffen door de bloed-hersenbarrière van primaten (mensen en apen). Er wordt geprobeerd nieuwe muissystemen voor dit type onderzoek op te zetten. Echter, in tegenstelling tot bij de apen, zijn deze op dit moment onvoldoende voorspellend voor de effecten in de mens.</p> |
| <p>4.2 Vermindering
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.</p> | <p>Alle methoden en procedures voor de identificatie van de peptiden die de bloed-hersenbarrière kunnen passeren via een specifiek mechanisme zijn eerst onderzocht en geselecteerd met (in zo ver mogelijk) <i>in vitro</i> selectiemethoden, zoals binding <i>in vitro</i> aan geselecteerde transportmoleculen en <i>in vivo</i> in muizenmodellen voordat de stap naar de makaken wordt gemaakt.</p> |
| <p>4.3 Verfijning
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.</p> | <p>De studies vinden plaats in makaken. In tegenstelling tot bij andere diersoorten, vertonen de transportmechanismen over de bloed-hersenbarrière in makaken de grootste overeenkomsten met die bij de mens. Deze overeenkomst is belangrijk omdat de geselecteerde peptiden gebruikt zullen gaan worden voor het opzetten van nieuwe therapieën tegen hersenkanker bij de mens. De dieren worden gedurende de hele duur van het experiment onder narcose gehouden waardoor ongerief zo veel mogelijk wordt voorkomen.</p> <p>Als uit deze studie blijkt dat we door het verkrijgen van ruggenmergvloeistof ook kunnen voorspellen hoe goed de passage van de peptiden is door de bloed-hersenbarrière, kunnen verder studies plaatsvinden zonder dat de dieren ge-euthanaseerd hoeven te worden.</p> |

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De dieren zijn gedurende de gehele procedure onder narcose, waarna euthanasie plaatsvindt. Gedurende de narcose wordt het welzijn van de dieren bewaakt door ervaren dierenartsen.

Dieren die intraveneus een injectie krijgen en 16-20 uur worden ge-euthanaseerd **kunnen niet gedurende de gehele periode onder narcose blijven omdat dit effect heeft op fysiologische parameters en daardoor de resultaten kan beïnvloeden**. Anders dan bijkomen uit sedatie worden geen negatieve effecten verwacht en gedurende deze tijd zullen ze geobserveerd worden door de diervverzorgers.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.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'.

10.2.g

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

- 1.3 Provide the title of the project.

Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

Basic research

Translational or applied research

Regulatory use or routine production

Research into environmental protection in the interest of human or

Research aimed at preserving the species subjected to procedures

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Malignant tumors of the brain and central nervous system (CNS) are relatively rare, representing approximately 3% of new cancer cases estimated worldwide. However, they cause significant morbidity and have a very poor prognosis. The average survival rate in adults with a primary malignant brain tumor is only 34.7%. Glioblastoma is the most common and aggressive malignant brain tumor and the treatment options are very limited (1). The current five-year survival rate is only 4% in patients aged 55-64. In children and adolescents, primary brain tumors are the leading cause of cancer-related death, surpassing leukemia. Additionally, most cancers that arise in other organs of the body have the ability to metastasize to the brain. An estimated 24-45% of all cancer patients have brain metastases, which is associated with poor survival and high morbidity. Consequently, brain cancer remains an area of urgent and unmet medical need.

Antibodies that specifically target certain antigens on tumor cells have proven to be highly effective in the treatment and/or eradication of a variety of highly malignant forms of cancers. However, many potential antibody therapies are not effective in brain cancer, largely because they are unable to cross the blood-brain barrier (BBB) (2). Recently, the collaborating institute has isolated small antibody binding domains (Variable new antigen receptor (VNAR) domains) to specific transporters concentrated in the BBB followed by rapid and robust penetration into the brain of mice using phage display libraries (3). Known transporters of the BBB that can be targeted for this purpose are e.g. transferrin receptors, low-density lipoprotein receptors and leptin receptors (4) VNAR domains are the smallest antibody recognition peptides that can be combined with monospecific antibodies to develop bispecific agents to be transported over the BBB. These peptides are currently studied in order to develop new treatment options for human diseases, including cancer (5,6). Mouse studies have demonstrated that some of these combinations can be readily pulled into the brains of mice. However, there are significant differences in receptor-mediated transport between distantly related species that preclude the direct translation of these mouse studies to humans. Quantitative proteomics studies have shown that there are major differences in the expression of BBB transporters between rodent and human but that the profile is nearly identical between primates (macaque/marmoset/human) (7-10).

There are several systems for the delivery of molecules into the brain that are currently investigated for delivery of molecules into the brain. In contrast to the use of phage libraries displaying VNAR, 2-BBB technology use glutathione PEGylated liposomes to delivery small molecules and is not suitable for the delivery of large molecules. Nanoparticle delivery is another approach being intensively explored but has also yet to achieve successful clinical translation. There are several programs for the development of new platforms to deliver large molecules using a variety of receptor-mediated transport systems but until now these platforms either do not have adequate pharmacokinetic properties or have safety issues that hamper clinical development.

Various in vitro screens have been developed to identify antibodies that bind to receptors. However, there are currently no validated in vitro transcytosis systems for the primate systems available that can predict the different aspects of in vivo binding and transport over the blood-brain barrier. None of the available in vitro methods currently provide antibodies or peptides of sufficient potency or safety for general clinical translation. For instance, many antibodies to the transferrin receptor selected in vitro have adverse effects in vivo because they interfere with function in vivo by either blocking transport of the endogenous ligand or targeting the receptors for lysosomal degradation. In contrast, injection of a VNAR phage display library that was pre-selected on transferrin receptor in vitro resulted in the identification of a highly potent binder that can cross the BBB without competing with transferrin or disrupting the receptor in mice. Using this phage display approach, it has been demonstrated that it is possible to isolate a highly potent and effective carrier for the delivery of large molecules across the BBB in the mouse system. Since there are major differences between the mouse and human BBB and their respective transporter sequences (7-10), the same approach for the identification and isolation of effective peptides (VNAR) that has proven successful in mice will be used in macaques to allow better translation to humans.

The process first involves a selection on purified recombinant receptor protein, to enrich the library with binders to the receptor, covering many different epitopes across the surface. To obtain domains to a

specific transporter, the VNAR phage display library is pre-selected in vitro on selected purified proteins. This pre-selected library, which already has been developed by the collaborators, will be injected into macaques to find the very rare binder that can cross the BBB through an active transport mechanism without disrupting it. Crossing the BBB is a very rare event and since the properties required for this are not known, many different sequences have to be tested. The most efficient way to do this is to test a large phage library containing many possible small antibody binding domains (VNAR). The phage library constructed by the collaborators contains a huge number of these VNAR domains ($>1 \times 10^{10}$) and each has a unique antigen binding sequence.

In the first part of the study, several polypeptides that are good candidates for follow up testing are identified. A promising polypeptide has been cloned into a vector carrying the hFc fragment of IgG. This construct has been expressed and purified and is referred to as antibody. This antibody recognizes and binds with high affinity to recombinant macaque and human Transferrin Receptor 1 (TfR1). It also binds and internalizes with high efficiency to human cerebral microvessel endothelial cells (hCMEC/D3).

Based on those characteristics the antibody is ranked highly for follow up confirmatory brain penetration tests in animals.

1. Sastry RA. et al, 2018. The impact of surgery on survival after progression of glioblastoma: a retrospective cohort analysis of the contemporary patient population. *J. Clin Neurosci* S0967-5868: 31541.
2. Sousa F. et al, 2018. Therapeutic monoclonal antibodies delivery for the glioblastoma treatment. *Adv Protein Chem Struct Biol* 112:61
3. Greenwood J et al, 2017. Current research into brain barriers and the delivery of therapeutics for neurological diseases: a report on CNS barrier congress London, UK, 2017. *Fluids Barriers CNS*, 14:31.
4. Zeiadeh I et al. 2018. Strategies for enhancing the permeation of CNS-active drugs through the blood-brain barrier, a review. *Molecules* 23:1289
5. Könning D et al. 2017. Semi-synthetic vNAR libraries screened against therapeutic antibodies primarily deliver anti-idiotypic binders. *Sci Rep* 7:9676.
6. Iezzi ME et al. 2018. Single-domain antibodies and the promise of modular targeting in cancer imaging and treatment. *Front Immunol* 9:273.
7. Uchida Y. et al. 2011, Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* 117:333
8. Hoshi Y et al. 2013. Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmosets. *J Pharm Sci* 102:3343.
9. Syvänen S. et al. 2009. Species differences in blood-brain transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metabolism and Disposition* 37:635.
10. Ito K. Et al. 2011. Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci* 100:3939.

3.2 Purpose

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

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

The overall aim is to develop new approaches to combat brain tumours. The brain-penetrating peptides (VNAR) identified and isolated in this project will be linked to therapeutic monoclonal antibodies to transport them into the brain to treat glioblastoma and CNS lymphoma in patients. However, the

approach and its applications are much broader. For example, this same approach can be used to identify peptides to different transporters in the BBB that will have different pharmacology. It is also possible to either genetically or chemically link the delivery peptide with a wide variety of large molecules in addition to monoclonal antibodies, such as enzymes, growth factors, antisense oligonucleotides, toxins and small molecules. These new therapeutic approaches may be useful in a wide range of CNS diseases besides brain cancer, including genetic disorders, neurodegenerative diseases, and CNS autoimmune diseases.

The specific objective of this project is to identify and isolate specific peptides (small antibody binding domains, so called VNAR) that are able to cross the BBB through a specific receptor-mediated transport mechanism in vivo in primates using a phage library expressing a large range of different VNAR. The phage library has been constructed by the collaborating partner and is available. The method that will be used for identification and isolation of the VNAR has been developed and used in mice by the partner. This project is a collaboration with the experts in the construction of above-mentioned products and experts in non-human primate research, which makes the project very likely to succeed.

3.3 Relevance

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

This project concerns applied, translational research on development of new tools to combat brain diseases, e.g. brain tumours. There are currently limited treatment possibilities for these devastating cancers and new treatment possibilities are therefore of major social importance. This project will be instrumental to identify and isolate small antibody binding domains (VNAR) that readily bind to receptors of the BBB and penetrate the brain without toxicity or influencing receptor activity. The VNAR identified in this project will subsequently be used to fuse them with monoclonal antibodies for future clinical research.

3.4 Research strategy

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

The overall strategy is to develop a brain delivery system using small antibody binding domains with the most potent activity that are optimized for the BBB transport system of primates. Peptides that bind a specific transport receptor are displayed on the surface of phage particles. This phage library expressing a large variety of VNAR is injected intravenously under full anaesthesia and the particles are allowed to circulate throughout the body for 2 to maximally 3 h hours. During this time, bacteriophages that display the correct VNAR will bind to receptors on the BBB and some of them will penetrate the brain parenchyma. The animals will remain under anaesthesia during the whole procedure. Anaesthesia has no effect on the binding and penetration of the VNAR-expressing bacteriophages. While still under anaesthesia the animals will be perfused to remove bacteriophages from the blood vessels and the animal will be euthanized. The brain is removed and fractionated to recover the phage particles from the brain parenchyma. The recovered bacteriophages are amplified in bacterial culture in vitro and purified to remove contaminants. Next, the recovered bacteriophage cultures are injected into other animals and the same procedures as described above will be performed. The starting library has only very few phages carrying a specific sequence that will bind to specific receptors and translocate into the brain. Once injected into the animal, most non-binding particles are rapidly cleared. The only way to detect whether a useful VNAR is correctly identified, is to re-inject more copies and determine if there is a corresponding increase in the number found in the brain. Two repeats of injection (in total three rounds) are the bare minimum required to detect a clear result regarding receptor binding and to obtain sufficient material for further analysis. This method targeting specific 'address codes' on the endothelium of particular organs using phage display peptide libraries was first described in 1996 by Pasqualini & Ruoslahti ([Nature](#) 380(6572):364-6). This has been successfully adapted for crossing of the capillary endothelium of the BBB.

The platform and procedures that have been developed were highly successful in mice and can be directly applied to non-human primates with only minor modifications. It is likely that the same approach will be

successful in primates for several reasons: 1) primate and mice use the same transporter systems to carry essential nutrients into the brain despite variations in their receptors; 2) pre-selected phage libraries that contain large numbers of unique peptide sequences to many different points on receptor are already prepared by the collaborating party; and 3) by performing various repeats of selection *in vivo*, binders that are the most functionally important and tailored to the BBB transport system of primates can be isolated. This project is a collaboration with the experts in the construction of above-mentioned products and experts in non-human primate research.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

The major aim is specific enrichment of bacteriophages to identify binding peptides of the BBB for later development of novel treatments for brain tumours. The project consists of repeated passage of the isolated bacteriophages in non-human primates in order to enrich the population that recognizes the specific receptors in the primate BBB transport system. The selection of leads for further characterization and development is determined by the copy number of each peptide sequence found in the brain parenchyma after each round of injecting the mixture. The leads with the best biophysical properties and brain uptake will be used to produce bi-specific delivery peptide-antibody products for targeting brain tumours (not included in this project)

After a first selection of a promising polypeptide-bacteriophage for brain penetration, the polypeptide is cloned into a vector carrying the hFc IgG fragment. This is the next step in the development of new compounds for brain tumors. We will test the brain delivery of this antibody in comparison to negative control antibody, which was selected based on no brain penetration in mice. Animals will be injected intravenously and after 16-20 h sedated for collection of CSF and blood followed by euthanasia and isolation of the brain. These data will be used to evaluate if CSF is suitable to be used as a brain surrogate for future work and testing of alternative antibodies without the need of sacrificing the animals.

The ultimate aim is to identify new compounds that pass the BBB and can be used for further development of novel treatments for brain tumours.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

In the first part of the study bacteriophage pools are passed in different macaques three times. If enrichment of the pools results in the selection of an interesting polypeptide, this will be used in a pilot study to determine if for further selection CSF can be used as brain surrogate to prevent euthanasia of animals for further selection of interesting compounds.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see 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'. 10.2.g
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 10.2.g
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 1 | Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

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.

The goal of the study is to identify peptides (small antibody that are able to cross the blood-brain barrier through a specific receptor-mediated transport mechanism. A method is used that has been successful in mice but due to large differences in receptors between mice and human it is not possible to translate the mouse data directly for clinical studies. Because of the higher genetic similarities with humans further selection and identification of relevant peptides are performed in macaques before going into clinical trials (1-4). The phage library expressing a large number of VNAR domains is injected intravenously under full anaesthesia and the particles are allowed to circulate throughout the body for approximately 2 to 3 hrs, while the animals remain anaesthetized. The animals are then perfused to remove non-binding or non-penetrating bacteriophages from the blood vessels. The animals are euthanized (while still under terminal anaesthesia) and the brain is removed and fractionated to recover the phage particles expressing the specific VNAR from the brain parenchyma.

After recovery of the bacteriophages from the brain parenchyma, the most active VNAR are found in the brain parenchyma. The number of copies of each particle from the brain is amplified by growth in bacterial culture in vitro. The starting library has only a very few phages carrying relevant binding sequences and once injected into the animal, many particles are rapidly cleared. For further enrichment and to ensure that the signals are real, it is necessary to inject more copies and determine if there is a corresponding increase in the number found in the brain. Therefore, the in vitro cultured bacteriophages isolated in the first round will be injected into new animals using the same procedures, followed by another isolation and reinjection into new animals in order to enrich the libraries and enhance the specificity as much as possible (in total three rounds of passage).

When an antibody that is a good candidate for follow up testing (further called compound) is selected a pilot study will be done in **maximal 5 animals to study** if CSF can be used a surrogate for brain penetration. The compound will be identified and amplified using next generation sequencing throughout the selection process. The compound's brain delivery will be compared to a negative control antibody, selected based on brain penetration in mice. In addition to the brain sampling, also CSF will be collected and evaluated for its suitability to be used as a brain surrogate for future work and testing of alternative antibodies without the need of sacrificing the animals in further studies (will be part of a new license application).

1. Uchida Y. et al. 2011, Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* 117:333
2. Hoshi Y et al. 2013. Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmosets. *J Pharm Sci* 102:3343.
3. Syvänen S. et al. 2009. Species differences in blood-brain transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metabolism and Disposition* 37:635.
4. Ito K. Et al. 2011. Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci* 100:3939.

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

The first part of the study concerns an in-life procedure that only involves anaesthesia of the animals followed by an intravenous of the bacteriophage library into the carotid artery to avoid the 1st pass through the liver. After a 2-3 hour interval under continuous anaesthesia and temperature control, the blood is cleared from the tissues by cardiac perfusion and the animal is euthanized by administering a dose of a lethal anaesthetic. The brain is removed post mortem. This procedure is identical to the approach in mice to identify highly potent VNAR that can carry a wide range of large molecules into the brain.

After selection of a promising candidate, 4 macaques are intravenously injected with the compound (2 animals) or a negative control (2 animals) under sedation. After recovery, the animals will remain housed in their home cage for another 16-20 h. The timepoint is selected based on the previous experience with rodents where the maximum brain exposure for majority of positive BBB transporters was observed to be 16-20h post injection. After this time, the animals will be anaesthetized, and CSF and (circulatory) blood will be taken from the animals followed by clearing of the blood from the tissues by cardiac perfusion and euthanasia. The brain will be removed post-mortem. This procedure will be identical to the approach described above. The amount of compound in the brain and CSF versus that in the circulation provides knowledge of the penetrability of the compound. **If unexpectedly one of the animals is not perfused well enough to analyze the result, we will repeat the procedure in an additional animal (maximal 1 animal)**

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

A total of 6 animals (3 rounds of 2 animals) is the minimal number of animals required for the experiment. There are no statistical tests to determine the number of animals required. The numbers are based upon earlier studies and experiences in mice in order to obtain sufficient enriched material for further research. In the experience of the collaborator, three rounds including 2 animals per round with in total three rounds are required to obtain sufficiently enriched populations that can be used in future clinical studies with sufficient assurance that only the most relevant and active peptides are identified

and isolated. The starting library has only very few phages carrying a specific sequence that will bind to specific receptors and translocate into the brain. Once injected into the animal, most non-binding particles are rapidly cleared. The only way to detect whether a useful peptide is correctly identified, is to inject the enriched culture and determine if there is a corresponding increase in the number found in the brain. Two repeats of injection (in total three rounds) are the bare minimum required to detect a clear result regarding receptor binding and to obtain sufficient material for further analysis. This method targeting specific receptors of particular organs using phage display peptide libraries was adapted from earlier studies (R. Pasqualini and E. Ruoslahti, 1996. Nature 380:364). Two animals per round are also considered to be the very minimum number to ensure that the experiment is reliable and reproducible. This is essential to ensure that only the most promising peptides are isolated for further development and future clinical studies. Experimental error can arise at a number of steps to artificially amplify a particular sequence or to increase the background noise. Seeing the same sequence enriched independently in two animals is essential to confirm that a particular brain-penetrating VNAR is not unique to a single individual and to confirm that the experiment has worked technically.

To pilot if CSF can be used as surrogate for brain penetration, we estimate that 2 animals injected with the most promising candidate and 2 animals injected with a control antibody will be sufficient to make an informed decision for future studies regarding the use of CSF. Controls are required to determine the enrichment in the CSF of the penetrating antibody compared to the non-penetrating antibody. The estimation is based on earlier studies and experiences in mice in order to obtain meaningful data for evaluation. **In case of an unexpected technical failures, e.g. insufficient perfusion of the brain making analysis not possible, we would like permission to use 1 additional animal to repeat the procedure. This will only be done in case of a failure and after consultation with, and approval by the Animal Welfare Body.**

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

In this study, adult rhesus macaques (*Macaca mulatta*) will be used. It is not expected that there are gender-dependent effects, therefore males and females can be included. All animals will be obtained from the in-house breeding colony. In contrast to rodents, macaques and humans show a comparable profile of expression and structure of BBB transporters (1-4). Therefore, in this study macaques are used to identify and isolate the specific peptides that can cross the BBB. Based on the mouse studies, a total of 6 animals is the minimal number of animals required for the specific selection of peptides that bind to selected transporters and penetrate the brain. In case additional enrichment is needed, or if other, newly identified BBB transporters need to be specifically targeted, a maximum of 6 more animals is anticipated to be required. In case the additional animals are needed, this will first be discussed with the Animal Welfare Body. A maximum of 12 animals will be used **for this part of the project. In addition, 5 animals (4 in study and one additional only in case of a required repeat) will be used to study if CSF can be used as surrogate for brain penetration to prevent the need for euthanasia and perfusion in future selection studies.**

1. Uchida Y. et al. 2011, Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* 117:333
2. Hoshi Y et al. 2013. Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmosets. *J Pharm Sci* 102:3343.
3. Syvänen S. et al. 2009. Species differences in blood-brain transport of three positron emission tomography radioligands with emphasis on P-glycoprotein transport. *Drug Metabolism and Disposition* 37:635.
4. Ito K. Et al. 2011. Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J Pharm Sci* 100:3939.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

For this project, animals will be selected that either have been used in previous studies (with maximal moderate discomfort) provided that prior treatments did not affect the BBB integrity or that must be euthanized for veterinary or ethical reasons, such as chronic diarrhea or social incompatibility. Final selection will be done in consultation with, and approval by the Institute's Animal Welfare Body and the Institute's veterinarians.

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.

D. 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.

Many in vitro screens have been carried out to identify antibodies that bind transporters of the BBB such as recombinant proteins or using over-expressing cells and identification of surface binding or internalization in culture. Validated in vitro transcytosis assays are not yet available for the primate system. The partner is currently working on validation of the mouse system using carriers that are highly effective in vivo but have yet to find an in vitro/in vivo correlation. Hopefully these in vitro BBB systems will become available sometime in the future, but at this point it is difficult to predict when. None of the in vitro methods have provided antibodies or peptides of sufficient potency or safety to date for general clinical translation. Many antibodies to e.g. the transferrin receptor have adverse effects because they interfere with function in vivo by either blocking transport of the endogenous ligand or targeting the receptors for lysosomal degradation. There are currently no in vitro methods to further determine passage of the BBB and obtain the required enrichment. Non-human primates are required since the BBB transport receptor is nearly identical to humans, while the receptor in rodents is more distant. To limit the use of primates, all of the methods and procedures to identify peptides that cross the BBB using a specific transport mechanism were developed over a several year period using both in vitro selection on recombinant proteins (structural studies) and in vivo selection in mice (proof-of-principle and first selection). Therefore, only a minimum number of animal is required to translate this approach to humans. Animals from previous studies can be used as long as prior treatments did not affect the BBB integrity. To prevent discomfort, the animals will be kept under anaesthesia during the entire study (2-3 h) after which the animals will be immediately euthanized. During this procedure, the animals will remain under continuous (clinical) observation, temperature will be maintained by placing them on warming pads and when needed, fluid infusion will be provided. All procedures on the animals will be performed by our own experienced veterinary team.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

All procedures will be performed under anaesthesia. In the first part, animals are euthanized at the end of the procedures. In the second part (pilot) animals will be sedated for i.v. injection and further procedures will be performed 16-20 h later under anaesthesia followed by euthanasia. **It has been considered to keep the animals under anaesthesia for 16-20 h, but due to potential effects on the study results, this is not possible.** All procedures are performed under BSL-2 conditions and no adverse effects on the environment are expected.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. 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 H.

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.

Classification of discomfort/humane endpoints**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In the second part of the study, the animals wake from sedation

Explain why these effects may emerge.

Recovery from sedation can cause confusion, nausea and distress

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

Animals that are sedated and wake up to follow for a further 16-20 h before euthanasia will be closely monitored.

J. 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 K.

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

Indicate the likely incidence.

n.a.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

12 animals non-recovery; 5 animals mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

To isolate the bacteriophages expressing the peptides of interest the brain parenchyma of the animals is needed.

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.

X Yes

Van: 10.2.e
Aan: [redacted]
Onderwerp: Schriftelijke ronde 10.2.g -2
Datum: maandag 3 augustus 2020 17:38:21

Waarde leden van de CCD,
De antwoorden op de gestelde vragen bij de bovenstaande wijzigingsaanvraag zijn binnen. In uw RVO mailbox staat een aanvullend advies klaar en de locatie van de nieuwe stukken. Indien mogelijk zou ik graag in de loop van deze week uw oordeel ontvangen.
Hartelijke groet,
10.2.e
[redacted]

34

Van: 10.2.e
Aan: [redacted]
Cc: Braunstahl, drs. F. (Ferry); 10.2.e
Onderwerp: RE: Schriftelijke ronde 10.2.g -2
Datum: dinsdag 4 augustus 2020 13:24:35

Dag 10.2. en anderen,
11.1
Tot vrijdag, 12.00 uur.
10.2.e

Van: 10.2.e
Verzonden: dinsdag 4 augustus 2020 08:51
Aan: 10.2.e 10.2.e
10.2.e
CC: Braunstahl, drs. F. (Ferry)
Onderwerp: RE: Schriftelijke ronde 10.2.g -2
LS,
11.1
Met hartelijke groet,
10.2.e

33

Van: 10.2.e
Verzonden: maandag 3 augustus 2020 20:18
Aan: 10.2.e
10.2.e
CC: Braunstahl, drs. F. (Ferry) <ferry.braunstahl@rvo.nl>
Onderwerp: RE: Schriftelijke ronde 10.2.g -2
Beste 10.2.
Ik heb de originele stukken gelezen 11.1
[redacted]
Groet,
10.2.e

32

10.2.e

Van: 10.2.e
Verzonden: maandag 3 augustus 2020 17:36
Aan: 10.2.e
10.2.e

31

CC: Braunstahl, drs. F. (Ferry) <ferry.braunstahl@rvo.nl>
Onderwerp: Schriftelijke ronde 10.2.g -2
Beste CCD leden,
Hierbij wil ik jullie verzoeken om een besluit te nemen over de wijzigingsaanvraag
10.2.g -2.
Achtergrond. 11.1

10.2.g

2(nazending)' submap 'Reactie aanhouden beoordelen'. Bij deze het aanvullend advies van het Secretariaat.

Er stonden voor deze aanvraag nog 2 vragen uit:

De eerste vraag betref het aantal dieren. In de wijzigingsaanvraag worden 8 extra makaken aangevraagd, waarvan 4 dieren voor een eventuele herhaling van de proef. Dit zou nodig zijn in het geval van onverwacht technisch falen of tegenstrijdige resultaten. De

11.1

Antwoord: De aanvrager heeft aangegeven dat de kans dat er 4 additionele dieren nodig zijn erg klein is, maar dat de ervaring leert dat in een enkel geval de perfusie (ondanks een gevalideerd standaard protocol) om onbekende redenen niet volledig is waardoor de analyse niet meer mogelijk is. De aanvrager heeft daarom het aantal 'reservedieren' teruggebracht van 4 naar 1. Dit dier zal enkel in het zeldzame geval van een mislukte perfusie worden gebruikt na overleg met en akkoord van de IvD. Het totaal aantal aangevraagde dieren komt daarmee op 5. In de ogen van het Secretariaat

11.1

De tweede vraag ging over de toename van het ongerief door, van terminaal naar licht, door het 2x onder narcose brengen van de dieren binnen korte tijd. De aanvrager is verzocht om toe te lichten hoe stressvol het voor de dieren is om in korte tijd 2x onder narcose te worden gebracht

11.1

Antwoord: De aanvrager geeft aan dat de dieren getraind zijn in het verkrijgen van sedatie, om de stress die de dieren ondergaan zoveel mogelijk te minimaliseren. Ook geeft de aanvrager aan dat de mogelijkheid van een langdurige sedatie van serieus is overwogen. Een langdurige narcose zou echter een gereede kans met zich meebrengen op negatieve effecten, zoals een verstoorde bloedcirculatie en mogelijk temperatuur gerelateerde effecten. Deze effecten kunnen mogelijk een negatieve invloed hebben op de uitkomst van de studie. Om deze reden is gekozen voor 2x een narcose binnen 20 uur.

Op basis van de bovenstaande argumenten is het Secretariaat

11.1

Advies.

Het Secretariaat is van oordeel

11.1

Mochten er nog onduidelijkheden zijn, dan hoor ik het uiteraard graag. Indien mogelijk hoor ik graag uiterlijk donderdag 6 augustus of jullie je kunnen vinden in het advies.

Hartelijke groet,

10.2.e

Van: 10.2.e
Aan: [redacted]
Cc: Braunstahl, drs. F. (Ferry)
Onderwerp: RE: Schriftelijke ronde 10.2.g -2
Datum: dinsdag 4 augustus 2020 17:12:27

Beste allen,
 De aanvrager heeft het aantal reservedieren naar 11.1
 [redacted] beantwoord. Wat mij betreft 11.1
 Tot vrijdag,
 10.2.e

From: 10.2.e
Sent: Monday, August 3, 2020 5:36 PM
To: 10.2.e

Cc: Braunstahl, drs. F. (Ferry)
Subject: Schriftelijke ronde 10.2.g -2

Beste CCD leden,
 Hierbij wil ik jullie verzoeken om een besluit te nemen over de wijzigingsaanvraag
 10.2.g -2.

Achtergrond. 11.1

[redacted] 10.2.g -
 2(nazending) submap 'Reactie aanhouden beoordelen'. Bij deze het aanvullend advies
 van het Secretariaat.

Er stonden voor deze aanvraag nog 2 vragen uit:

De eerste vraag betrof het aantal dieren. In de wijzigingsaanvraag worden 8 extra
 makaken aangevraagd, waarvan 4 dieren voor een eventuele herhaling van de proef. Dit
 zou nodig zijn in het geval van onverwacht technisch falen of tegenstrijdige resultaten. De
 11.1

Antwoord: De aanvrager heeft aangegeven dat de kans dat er 4 additionele dieren nodig
 zijn erg klein is, maar dat de ervaring leert dat in een enkel geval de perfusie (ondanks een
 gevalideerd standaard protocol) om onbekende redenen niet volledig is waardoor de
 analyse niet meer mogelijk is. De aanvrager heeft daarom het aantal 'reservedieren'
 teruggebracht van 4 naar 1. Dit dier zal enkel in het zeldzame geval van een mislukte
 perfusie worden gebruikt na overleg met en akkoord van de IvD. Het totaal aantal
 aangevraagde dieren komt daarmee op 5. In de ogen van het Secretariaat 11.1

De tweede vraag ging over de toename van het ongerief door, van terminaal naar licht, door het
 2x onder narcose brengen van de dieren binnen korte tijd. De aanvrager is verzocht om toe te
 lichten hoe stressvol het voor de dieren is om in korte tijd 2x onder narcose te worden gebracht

11.1

Antwoord: De aanvrager geeft aan dat de dieren getraind zijn in het verkrijgen van sedatie, om de stress die de dieren ondergaan zoveel mogelijk te minimaliseren. Ook geeft de aanvrager aan dat de mogelijkheid van een langdurige sedatie van serieus is overwogen. Een langdurige narcose zou echter een gerede kans met zich meebrengen op negatieve effecten, zoals een verstoorde bloedcirculatie en mogelijk temperatuur gerelateerde effecten. Deze effecten kunnen mogelijk een negatieve invloed hebben op de uitkomst van de studie. Om deze reden is gekozen voor 2x een narcose binnen 20 uur.

Op basis van de bovenstaande argumenten is het Secretariaat 11.1

Advies.

Het Secretariaat is van oordeel 11.1

Mochten er nog onduidelijkheden zijn, dan hoor ik het uiteraard graag. Indien mogelijk hoor ik graag uiterlijk donderdag 6 augustus of jullie je kunnen vinden in het advies.

Hartelijke groet,

10.2.e

Van: 10.2.e
Aan: [redacted]
Onderwerp: RE: Schriftelijke ronde 10.2.g -2
Datum: vrijdag 7 augustus 2020 13:57:17

Dag 10.2.
 Ik begreep dat je met vakantie bent. Gezien het feit dat 11.1

Nog een fijne vakantie gewenst.
 Met vriendelijke groet,
 10.2.

Van: 10.2.e
Verzonden: maandag 3 augustus 2020 17:36
Aan: 10.2.e

CC: Braunstahl, drs. F. (Ferry)
Onderwerp: Schriftelijke ronde 10.2.e -2

Beste CCD leden,
 Hierbij wil ik jullie verzoeken om een besluit te nemen over de wijzigingsaanvraag
 10.2.e -2.

Achtergrond. 11.1

2(nazending)' submap 'Reactie aanhouden beoordelen'. Bij deze het aanvullend advies
 van het Secretariaat.

Er stonden voor deze aanvraag nog 2 vragen uit:

De eerste vraag betrof het aantal dieren. In de wijzigingsaanvraag worden 8 extra
 makaken aangevraagd, waarvan 4 dieren voor een eventuele herhaling van de proef. Dit
 zou nodig zijn in het geval van onverwacht technisch falen of tegenstrijdige resultaten. De
 11.1

Antwoord: De aanvrager heeft aangegeven dat de kans dat er 4 additionele dieren nodig
 zijn erg klein is, maar dat de ervaring leert dat in een enkel geval de perfusie (ondanks een
 gevalideerd standaard protocol) om onbekende redenen niet volledig is waardoor de
 analyse niet meer mogelijk is. De aanvrager heeft daarom het aantal 'reservedieren'
 teruggebracht van 4 naar 1. Dit dier zal enkel in het zeldzame geval van een mislukte
 perfusie worden gebruikt na overleg met en akkoord van de IvD. Het totaal aantal
 aangevraagde dieren komt daarmee op 5. 11.1

De tweede vraag ging over de toename van het ongerief door, van terminaal naar licht, door het
 2x onder narcose brengen van de dieren binnen korte tijd. De aanvrager is verzocht om toe te

lichten hoe stressvol het voor de dieren is om in korte tijd 2x onder narcose te worden gebracht en of het eventueel minder ongerief op zou leveren als de dieren gedurende het gehele experiment onder narcose worden gehouden.

Antwoord: De aanvrager geeft aan dat de dieren getraind zijn in het verkrijgen van sedatie, om de stress die de dieren ondergaan zoveel mogelijk te minimaliseren. Ook geeft de aanvrager aan dat de mogelijkheid van een langdurige sedatie van serieus is overwogen. Een langdurige narcose zou echter een gerede kans met zich meebrengen op negatieve effecten, zoals een verstoorde bloedsomloop en mogelijk temperatuur gerelateerde effecten. Deze effecten kunnen mogelijk een negatieve invloed hebben op de uitkomst van de studie. Om deze reden is gekozen voor 2x een narcose binnen 20 uur.

Op basis van de bovenstaande argumenten is het Secretariaat ^{11.1} [redacted]

[redacted]

[redacted]

Advies.

Het Secretariaat is van oordeel dat ^{11.1} [redacted]

[redacted]

Mochten er nog onduidelijkheden zijn, dan hoor ik het uiteraard graag. Indien mogelijk hoor ik graag uiterlijk donderdag 6 augustus of jullie je kunnen vinden in het advies.

Hartelijke groet,

10.2.e [redacted]



Advies aan CCD

B

Datum 07 augustus 2020

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven 10.2.g -2

Instelling: 10.2.g
Onderzoeker: 10.2.e
Project: Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies
Betreft: Wijziging
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

1

Voor aanvraag 10.2.g is een wijzigingsaanvraag ingediend. Deze is geregistreerd als 10.2.g -2. Het project is getiteld: Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies .

Proces	<p>Het Secretariaat stelt voor om de volgende vragen te stellen:</p> <ul style="list-style-type: none"> - In uw wijzigingsaanvraag vraagt u 8 extra dieren aan, waarvan 4 dieren voor een eventuele herhaling van de proef in het geval van onverwacht technisch falen of tegenstrijdige resultaten. In onze ogen is de noodzaak van deze extra dieren echter onvoldoende onderbouwd. Zo blijkt uit de aanvraag niet welke vormen van technisch falen kunnen leiden tot het mislukken van de proef en vragen wij ons af of het niet mogelijk is om de noodzaak voor het gebruik van 'reservedieren' niet voorkomen kan worden door het treffen zorgvuldige voorzorgsmaatregelen. Ook is niet duidelijk in wat u verstaat onder tegenstrijdige resultaten en waarom deze een eventuele herhaling van de proef zouden rechtvaardigen. Wij zouden op deze punten graag extra toelichting en onderbouwing van u ontvangen. - Het ongerief in verband met de extra proeven zal toenemen van terminaal naar licht, omdat de dieren tussen de injectie van de compound en het moment dat ze geüthanaseerd worden weer bij bewustzijn komen. Volgens de wet op de dierproeven is het verplicht om dierproeven op de meest verfijnde manier uit te voeren en het ongerief voor de dieren zoveel mogelijk te beperken. Wij vragen ons daarom af hoe stressvol het voor de dieren is om in korte tijd 2x onder narcose te worden gebracht en of het eventueel minder ongerief op zou leveren als de dieren gedurende het gehele experiment onder narcose worden gehouden. Wij horen graag wat uw gedachten hierover.
Inhoud wijziging	<p>Om te bestuderen of een in dit project geïdentificeerde veelbelovende polypeptide-bacteriophage voor het over de bloed-hersens barrière (BBB) transporteren van behandelingen voor herentumoren. Onderzocht wordt of de geïdentificeerde polypeptide-bacteriophage beter dan een controle antibody, de BBB kan passeren. Hiervoor worden enerzijds de resultaten uit de eerdere studie met peptide gevalideerd. Anderzijds wordt gekeken of men de peptide-antibody kan terugvinden in zowel het cerebrospinaal vloeistof (CSF) als bij isolatie uit het hele brein.</p> <p>Hiervoor zullen 8 extra makaken aan bijlage 3.4.4.1 worden toegevoegd. Deze extra dieren zullen licht ongerief ondervinden, terwijl de 12 origineel vergunde dieren enkel terminaal ongerief ervaren. Dit komt doordat de extra omdat 1x extra onder narcose worden gebracht.</p>

<p>Reden wijziging</p>	<p>Citaat begeleidende brief:</p> <p>The goal of the study is to identify peptides (small antibodies) that are able to cross the blood-brain barrier (BBB) through a specific receptor-mediated transport mechanism and ultimately be later used to deliver functional therapeutic payloads specifically to the brain. As described in the original study proposal, we used a method that has been successful in mice. In the study described under the original approval 10.2.g [REDACTED], it has been possible to identify an antibody that is a good candidate for follow up testing (further called compound). This compound recognizes and binds with high affinity to recombinant macaque and human Transferrin Receptor 1 (TfR1). It also binds and internalizes with high efficiency to human cerebral microvessel endothelial cells (hCMEC/D3).</p> <p>Based on those characteristics the compound is ranked highly for follow up confirmatory brain penetration tests in animals. To proceed this compound and in addition test if CSF can be used as predictor of brain enrichment of selected compounds, we propose a pilot to test the compound's brain delivery in comparison to a selected negative control antibody. In addition to the brain sampling, we will also collect CSF, which will be evaluated for its suitability to be used as a brain surrogate for future work and testing of alternative, promising antibodies without the need of sacrificing the animals. When successful, we will include this in a new application for further testing.</p>
-------------------------------	--

2
Ingediende meldingen en wijzigingen

Nr.	Datum	Omschrijving
1	04-11-2019	<i>Melding Citaat:</i> Onder projectvergunning 10.2.g hebben we toestemming om ten behoeve van de ontwikkeling van nieuwe therapie tegen hersentumoren 12 resus makaken te gebruiken. Dit betreft een studie onder terminale sedatie (non-recovery). Hiervoor worden dieren geselecteerd die al eerder in een studie zijn geweest met maximaal matig ongerief of dieren die om ethische of veterinaire redenen ge-euthanaseerd zullen gaan worden. Op dit moment hebben we 6 Java apen die voldoen aan de laatste eisen. Deze dieren zijn wat betreft onze vraagstelling identiek aan resus apen. Daarom is besloten dat we in plaats van resus apen, 6 Java apen gebruiken voor dit project. Dit is voorgelegd aan de IvD van de instantie. Er zijn geen veranderingen in vraagstelling, herkomst en huisvesting dieren, dierhandelingen, ongerief en aantal dieren.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	12 / 17	100,0% Terminaal / 60,0% Terminaal 40,0% Licht

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

Het betreft onderzoek in niet-menselijke primaten die mogelijk worden hergebruikt uit eerdere projecten.

Locatie uitvoering experimenten	
Maatschappij	Er wordt verwacht dat het onderwerp in die mate politiek of maatschappelijk gevoelig is, dat eventuele extra communicatie uitingen nodig zijn. Het betreft onderzoek in niet-menselijke primaten (10e). Dieren zullen gedood worden aan het einde van de proef.

3

Beoordeling wijziging door DEC

DECadvies**Citaat C1. (samenhang)**

De voorgestelde wijziging sluit aan bij de in het project beschreven doelstelling, namelijk het identificeren van stukjes eiwit (peptides) die de bloed-brein barrière (BBB) kunnen passeren. In eerdere experimenten is een veelbelovend peptide gevonden. Bij de eerdere experimenten vormde dit peptide echter een fractie van een zeer diverse pool van peptiden. Bij de huidige wijziging in de aanvraag wordt een volgende stap genomen in de ontwikkeling van een therapeutische compound die de BBB kan passeren door dit peptide te koppelen aan het Fc gedeelte van een humane IgG (peptide-antibody). Door te bestuderen of dit peptide-antibody ook selectief, dus beter dan een controle antibody, de BBB kan passeren worden enerzijds de resultaten uit de eerdere studie met peptide gevalideerd. Anderzijds wordt gekeken of men de peptide-antibody kan terugvinden in zowel het cerebrospinaal vloeistof (CSF) als bij isolatie uit het hele brein. Indien het aantonen van het peptide-antibody in het CSF succesvol is dan zullen in de toekomst geen dieren hoeven te worden geëuthanaseerd om aan te tonen dat een therapeutisch molecuul via de antibody de hersenen heeft bereikt. Het aantal dieren voor deze studie is realistisch in geschat op maximaal 8. Het verwachte ongerief voor de dieren is duidelijk omschreven en de uitkomsten van deze experimenten zijn helder en meetbaar.

Citaat C9. (bijzondere categorieën):**Niet-menselijke primaten (10e)**

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de overeenkomst in structuur en moleculaire samenstelling van de BBB tussen resusapen en mensen.

Hergebruik (1e, lid 2)

Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

Citaat C14. (vervanging):

In dit project wordt gezocht naar peptides of de daarop gebaseerde peptide-antibodies die het transport van therapeutisch moleculen (cargo) over de BBB faciliteren. De BBB is nog niet in vitro na te bootsen. De beschreven experimenten borduren voort op eerdere resultaten behaald in makaken.

Citaat C15 (vermindering):

Het aantal benodigde dieren wordt realistisch ingeschat. Er worden twee dieren tegelijk gebruikt voor het te testen kandidaat peptide-antibody en twee dieren voor het controle antibody. Tevens wordt eenzelfde aantal

dieren aangevraagd voor het eventueel herhalen van het experiment indien het eerste experiment niet slaagt door onverwachte technische problemen of onduidelijke resultaten.

Citaat C16 (verfijning):

Het experiment wordt uitgevoerd onder sedatie. Daarna zullen de dieren nog 14-16 uur in studie blijven, waarna onder sedatie CSF wordt afgenomen, perfusie plaats vindt en de dieren worden geëuthanaseerd. Dieren worden gedurende het experiment gemonitord door een ervaren dierenarts. Indien de gewenste resultaten ook verkregen kunnen worden door afname van CSF dan zal dit leiden tot verdere verfijning van toekomstige experimenten, aangezien euthanasie dan niet langer nodig is. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Citaat C19. (doden):

De dieren worden gedood tijdens de proef. Dit is nodig omdat bepaald moet worden in hoeverre het kandidaat peptide-antibody in vergelijking met een controle antibody selectief de BBB kan passeren. Ook om vast te kunnen stellen of detectie in CSF voldoet dient een vergelijking met de hersenen gemaakt te worden. Dieren worden volgens de richtlijn gedood.

Citaat C20. (herplaatsing):

Dieren die in een voorgaand experiment zijn gebruikt kunnen voor dit experiment hergebruikt worden. Echter, aangezien de hersens nodig zijn voor het vervolgtraject, worden de dieren gedurende het experiment gedood.

Ethische afweging van de DEC:

1. Rechtvaardigt het valideren van het vermogen van reeds eerder geselecteerde kandidaat peptiden om na koppeling aan een antibody de BBB te passeren en het testen of CSF gebruikt kan worden als een alternatief voor het vaststellen van BBB penetratie het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen?

2. De waarden voor het onderzoeksveld is vooral gelegen in de identificatie van peptiden die het mogelijk maken dat therapeutisch moleculen de BBB passeren. De huidige wijziging betreft een vervolgstap in het onderzoek, waarin een uit eerdere studies geselecteerd veelbelovend peptide gekoppeld is aan een antibody en vergeleken wordt met een controle antibody om zodoende het selectief vermogen van de

kandidaat peptide-antibody om de BBB te passeren vast te kunnen stellen.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Onder sedatie wordt het peptide -antibody in de bloedbaan ingespoten. Daarna zullen de dieren nog 14-16 uur in studie blijven, waarna onder sedatie CSF wordt afgenomen, perfusie plaats vindt en de dieren worden geëuthanaseerd. De dieren ondervinden hiervan licht ongerief.

De waarden voor de samenleving is vooral gelegen in de identificatie van peptide-antibodies die het mogelijk maken de BBB te passeren. Als de zoektocht succesvol wordt afgerond en de resultaten extrapoleerbaar zijn naar de mens zal dit breed toepasbaar kunnen worden in de behandeling van verschillende hersenziektes. Dit is echter wel iets dat pas op lange termijn duidelijk zal worden. Daarmee is dit onderzoek van aanmerkelijk belang.

Dit onderzoek kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen verschillende hersenziektes. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

3. De DEC concludeert dat de belangen van het onderzoeksveld en de samenleving die worden nagestreefd in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.

Het onderzoek is op langere termijn van groot belang voor mensen, omdat het dringend nodig is om antikanker medicijnen door de BBB heen te kunnen brengen.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door de veelbelovende resultaten die met muizen en recent ook in makaken zijn behaald. De gekozen strategie voor het valideren van het selectieve vermogen van het kandidaat peptiden-antibodies om de BBB te passeren is overtuigend. Het afnemen van CSF tijdens deze procedure kan belangrijk bijdragen tot verder verfijning van de experimenten. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op fysiologische en moleculaire gelijkenissen tussen mensen en resusapen wat betreft de BBB.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. De experimentele opzet is reeds eerder toegepast in de resusaap binnen dit instituut, met positieve resultaten. Dit onderzoek kan

alleen worden uitgevoerd in de resusaap, aangezien deze dieren meer vergelijkbaar zijn met de mens dan muizen. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoort, de dieren zijn afkomstig uit eigen fok, de 3V-principes worden gehonoreerd door toepassing van sedatie, het voortdurend monitoren van de dieren en hergebruik van dieren. Het ongerief wordt alleen veroorzaakt door de sedatie. De dieren worden gedood aan het einde van het experiment.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

4 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

Onder C13 schrijft u dat het een terminaal experiment betreft, wat het ontbreken van humane eindpunten zou valideren. Dit is echter technisch gezien onjuist, de dieren zullen weer uit narcose ontwaken voordat de de proef ten einde loopt. Wij zijn het overigens eens met uw oordeel dat humane eindpunten niet noodzakelijk zijn gezien de aard van de handelingen.
--

5 Inhoudelijke beoordeling

Hergebruik

Er is sprake van hergebruik van dieren.

3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides: CITAAT: Additional, animals from previous studies can be used as long as prior treatments did not affect the BBB integrity.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides	Ja	volgens de richtlijn.

6 Samenvatting

11.1 [Redacted]

11.1 [Redacted]

11.1 [Redacted]

7 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

11.1 [Redacted]

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2022 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

8 Concept beschikking voor akkoord CCD

40

Van: Secretariaat OBDA
Aan: 10.2.e
Onderwerp: RE: Ondertekening 10.2.g -2 akkoord
Datum: maandag 10 augustus 2020 15:02:34

Ok, ik verstuur het NIET.
Groet,
10.2.e

Van: 10.2.e

Verzonden: maandag 10 augustus 2020 13:40

Aan: Secretariaat OBDA

Onderwerp: FW: Ondertekening 10.2.g -2 akkoord

Hoi 10.2.e,

Deze beschikking aub niet opsturen. Er moeten handmatig nog een aantal zaken worden aangepast.

Alvast bedankt!

Groet,

10.2.e

Van: info@zbo-ccd.nl <info@zbo-ccd.nl>

Verzonden: maandag 10 augustus 2020 13:14

Aan: Secretariaat OBDA <SecretariaatOBDA@rvo.nl>

CC: 10.2.e

Onderwerp: Ondertekening 10.2.g -2 akkoord

Beste 10.2.e

39

38

De beschikking van aanvraag 10.2.g -2 is ondertekend.

Het betreft een wijziging.

Ferry Braunstahl

47

Van: Braunstahl, drs. F. (Ferry)
Aan: 10.2.e
Cc:
Onderwerp: RE: Ondertekening 10.2.g -2
Datum: maandag 10 augustus 2020 16:53:06

Ha 10.2.e

Ik dacht dat ik deze al gezien had in MAUS. Akkoord qua inhoud, ik zie alleen dat in deze pdf versie in de beschikking

Iets mis gaat... er lopen twee zinnen door elkaar / over elkaar heen gedrukt (2a en 2b onder 'het besluit is gebaseerd op de volgende stukken:'

En ik zag nog een typo: weggevalen z in

Beslissing

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed.

Pas jij m aan en stuur je m dan aan het secretariaat voor verzending?

THNX, Ferry

Van: 10.2.e

Verzonden: maandag 10 augustus 2020 15:52

Aan: Braunstahl, drs. F. (Ferry)

Onderwerp: FW: Ondertekening 10.2.g -2

Kun jij deze doen? 10.2.e jouw handtekening eronder gezet.

Van: 10.2.e

Verzonden: maandag 10 augustus 2020 15:36

Aan: 10.2.e

Onderwerp: RE: Ondertekening 10.2.g -2

En bij deze ook de beschikking

Van: 10.2.e

Verzonden: maandag 10 augustus 2020 14:13

Aan: 10.2.e

Onderwerp: RE: Ondertekening 10.2.g -2

Als je deze wilt laten tekenen dan ook nog effe "concept" eraf halen

Van: 10.2.e

Verzonden: maandag 10 augustus 2020 12:45

Aan: 10.2.e

Onderwerp: RE: Ondertekening 10.2.g -2

Hoi 10.2.e

Bij deze de handmatig aangepaste beschikingsbrief. Als jij hem tekent zal ik hem zelf versturen naar de aanvrager.

Kun jij in MASU nog even de memo aan het secretariaat sturen dat de automatische beschikking niet hoeft te worden opgestuurd?

Groet!

10.2.e

Van: 10.2.e

Verzonden: maandag 10 augustus 2020 12:24

Aan: 10.2.e

Onderwerp: RE: Ondertekening 10.2.g -2

Voor wijzigingen zouden we e.e.a. toch handmatig aanpassen?! Kun je de aangepaste versie aan me sturen, dan weet ik wat ik teken?!

Groeten,

10.2.e

Van: info@zbo-ccd.nl <info@zbo-ccd.nl>

Verzonden: vrijdag 7 augustus 2020 13:49

Aan: Braunstahl, drs. F. (Ferry) <ferry.braunstahl@rvo.nl>; 10.2.e

46

45

44

43

42

41

CC: 10.2.e [redacted]

Onderwerp: Ondertekening 10.2.g [redacted]-2

Aanvraag 10.2.g [redacted]-2 staat klaar ter ondertekening.

Het betreft een wijziging.

Opmerkingen voor de manager:

@ 10.2.e er staan twee grotendeels identieke alinea's in de beschikking over de beoordeling achteraf. Misschien een beetje overbodig, maar opzich niet bezwaarlijk.

10.2.e [redacted]

Van: 10.2.e
Aan: [Secretariaat OBDA](#)
Onderwerp: Opsturen beschikking 10.2.g -2
Datum: dinsdag 11 augustus 2020 12:17:11
Bijlagen: [Beschikking 10.2.g -2.pdf](#)
10.2.g -2 DECadvies.pdf

Hoi 10.2.e

Kun je deze beschikking en het bijbehorende DEC advies opsturen naar de vergunninghouder?
Alvast bedankt!

10.2.e

Van: 10.2.e
Aan: [Secretariaat OBDA](#)
Onderwerp: Publiceren NTS A10.2.g-2
Datum: dinsdag 11 augustus 2020 12:18:36
Bijlagen: 10.2.g-2 NTS publicatie.pdf

Hoi 10.2.e
Ook de NTS van 10.2.g-2 mag worden gepubliceerd.
Bijzonderheden: Nee
Beoordeling achteraf: Ja
Groetjes!

10.2.e

Van: Info-zbo
Aan: 10.2.e
Cc: [redacted]
Bcc: [redacted]
Onderwerp: Beschikking 10.2.g -2
Datum: dinsdag 11 augustus 2020 16:53:22
Bijlagen: [Beschikking 10.2.g -2.pdf](#)
10.2.g -2 DECadvies.pdf

Geachte 10.2.e [redacted]

Bijgaand de beschikking van uw wijziging 10.2.g [redacted] -2, waar wij gemakshalve naar verwijzen.

Met vriendelijke groeten,

Namens de Centrale Commissie Dierproeven
10.2.e [redacted]

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g
10.2.e
10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
10.2.g -2
Bijlagen
3

Datum 11 augustus 2020
Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

10.2.e
Geachte

Op 3 maart 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies" met aanvraagnummer 10.2.g -2. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf 11 augustus 2020 is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging(en) uit te voeren binnen de vergunning, die is afgegeven van 1 augustus 2018 tot en met 31 juli 2021.

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 waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2022 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:
10 augustus 2020
Aanvraagnummer:
10.2.g -2

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC 10.2.g (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 3 juni 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 13 juli 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de anesthesie en het aantal dieren. 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 van de wet. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2022 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.

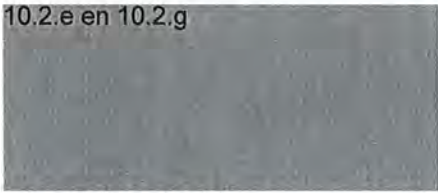
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

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: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2.e en 10.2.g



drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
10 augustus 2020
Aanvraagnummer:
10.2.g [redacted] -2



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

10.2.g

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2018 tot en met 31 juli 2021, voor het project

"Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies " met aanvraagnummer 10.2.g -2, na advies van dierexperimentencommissie DEC 10.2.g

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Afdelingshoofd .

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 3 maart 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 23 juli 2020;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides, zoals ontvangen op 23 juli 2020;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 23 juli 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 3 juni 2020
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 23 juli 2020.

De oorspronkelijke vergunning wordt als volgt gewijzigd:

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	12 / 17	100,0% Terminaal / 60,0% Terminaal 40,0% Licht

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2022 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Aanvraagnummer:

10.2.g -2

Geldende voorschriften

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

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

10.2.g -2

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 onvereenigbaar 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:

10.2.g -2

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

Levensloopdossier

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloopdossier bijgehouden worden.

Niet-menselijke primaten

De Minister heeft een ontheffing verleend volgens artikel 10e, zevende lid van de wet, die het gebruik van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

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

Aanvraagnummer:

10.2.g -2

leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.

Van: info@zbo-ccd.nl
Aan: 10.2.g
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag 10.2.g -2
Datum: dinsdag 11 augustus 2020 17:14:02

Geachte DEC 10.2.g

Op 03-03-2020 hebben wij een wijziging op een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies ' met aanvraagnummer 10.2.g -2.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op de anesthesie en het aantal dieren.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 11-8-2020.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. Onder C13 schrijft u dat het een terminaal experiment betreft, wat het ontbreken van humane eindpunten zou valideren. Dit is echter technisch gezien onjuist, de dieren zullen weer uit narcose ontwaken voordat de de proef ten einde loopt. Wij zijn het overigens eens met uw oordeel dat humane eindpunten niet noodzakelijk zijn gezien de aard van de handelingen.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, 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: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl



Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Identificatie en isolatie van peptiden voor passage door de bloed-hersenbarrière ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen hersenkanker
1.2 Looptijd van het project	01-08-2018 tot 31-07-2021
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Peptiden, Bacteriofagen, bloed-hersen barrière, kankertherapie, makaken

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Kwaadaardige tumoren in de hersenen vertegenwoordigen ongeveer 3% van het aantal kankergevallen wereldwijd. Deze kankers geven echter zeer grote problemen in de patiënten en hebben echter een zeer slechte prognose. De meest algemene en dodelijke vorm van hersenkanker is het glioblastoom, met een 5-jaar overleving van slechts 4% in patiënten van middelbare leeftijd. Daarnaast zaaien ook kankers van andere organen zich regelmatig uit naar de hersenen. Op dit moment zijn de behandelmogelijkheden beperkt. Van verschillende specifieke antilichamen is aangetoond dat deze effectief kunnen zijn tegen verschillende kankers. Echter, door de bloed-hersen barrière kunnen
---	--

deze antilichamen niet de hersentumoren bereiken. Daarom zal in dit project onderzoek worden gedaan naar het ontdekken van specifieke stukjes eiwit (peptiden) die binden aan speciale structuren op de bloed-hersenbarrière en deze daarna wel kunnen passeren. Deze peptiden kunnen dan in een vervolgstudie gebonden worden aan antilichamen die op deze manier dan mogelijk wel de bloed-hersenbarrière kunnen passeren en de tumoren bereiken. In muizen is een techniek ontwikkeld waarbij zogenaamde bacteriofagen werden gebruikt die verschillende stukjes eiwit op hun oppervlak hebben. Deze methode resulteerde in de identificatie van eiwitstukjes die de bloed-hersenbarrière bij muizen kunnen passeren. De eigenschappen van de bloed-hersenbarrière van de muis en mens zijn echter beperkt vergelijkbaar. In tegenstelling tot de muis zijn de resusaap en de mens met betrekking tot de bloed-hersenbarrière heel vergelijkbaar. Daarom worden voor deze studie apen gebruikt om de latere kans op slagen bij patiënten zo groot mogelijk te maken. Apen worden hiertoe ingespoten met zogenaamde bacteriofagen die allemaal verschillende eiwitstukjes die mogelijk interessant zijn voor het doel van dit onderzoek op hun oppervlak hebben. De bacteriofagen die de juiste eiwitstukjes hebben om de bloed-hersenbarrière te kunnen passeren kunnen op deze wijze uit de hersenen geïsoleerd worden. Dit moet enkele keren herhaald worden omdat dit om heel kleine aantallen gaat en om alleen de juiste stukken te identificeren en isoleren die later gebruikt kunnen worden voor kankertherapie bij patiënten.

Geschikte kandidaten worden met speciale moleculair-biologische technieken gekoppeld aan een stukje van een humaan antilichaam (IgG). Dit product wordt in een pilotstudie vervolgens ingespoten bij apen om te onderzoeken of dit in voldoende mate de bloed-hersen barrière passeert. Ook zal ruggenmergvloeistof verkregen via een ruggenprik worden genomen om te onderzoeken of dit een bruikbare methode is om de beste kandidaten voor verdere ontwikkeling te selecteren.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Het project zal resulteren in de isolatie en identificatie van specifieke eiwitstukken die de bloed-hersenbarrière kunnen passeren. Dit project vormt de basis voor het ontwikkelen van de nieuwe, beoogde kankertherapie. Bij vervolgonderzoek van het voorgestelde project zullen deze eiwitstukken gebruikt worden om te koppelen aan antilichamen om op termijn mogelijk hersentumoren in patiënten te kunnen behandelen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

17 makaken (*Macaca mulatta*; *Macaca fascicularis*)

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Gedurende de studie zijn de dieren onder volledige narcose waarna de dieren direct worden ge-euthanaseerd. Bij selectie van een goede kandidaat zullen maximaal 5 dieren bijkomen uit narcose in hun thuishok waarna de dieren na 16-20 h onder volledige narcose worden ge-euthanaseerd.

- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? maximaal 12 dieren terminaal (non-recovery), maximaal 5 dieren licht
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? Omdat de hersenen nodig zijn worden de dieren ge-euthanaseerd

4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.
Om te bepalen of peptiden de bloed-hersenbarrière kunnen passeren na inspuiten zijn intacte, levende dieren nodig. Er bestaan geen *in vitro* systemen om zowel de binding, transport en verrijking van de peptiden in de hersenen na systemische toediening volledig te onderzoeken. Dit kan deels met behulp van zogenaamde transcytose assays, maar er bestaan momenteel nog geen gevalideerde *in vitro* systemen voor het onderzoek naar transport van grotere stoffen door de bloed-hersenbarrière van primaten (mensen en apen). Er wordt geprobeerd nieuwe muissystemen voor dit type onderzoek op te zetten. Echter, in tegenstelling tot bij de apen, zijn deze op dit moment onvoldoende voorspellend voor de effecten in de mens.
- 4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.
Alle methoden en procedures voor de identificatie van de peptiden die de bloed-hersenbarrière kunnen passeren via een specifiek mechanisme zijn eerst onderzocht en geselecteerd met (in zo ver mogelijk) *in vitro* selectiemethoden, zoals binding *in vitro* aan geselecteerde transportmoleculen en *in vivo* in muizenmodellen voordat de stap naar de makaken wordt gemaakt.
- 4.3 **Verfijning**
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
De studies vinden plaats in makaken. In tegenstelling tot bij andere diersoorten, vertonen de transportmechanismen over de bloed-hersenbarrière in makaken de grootste overeenkomsten met die bij de mens. Deze overeenkomst is belangrijk omdat de geselecteerde peptiden gebruikt zullen gaan worden voor het opzetten van nieuwe therapieën tegen hersenkanker bij de mens. De dieren worden gedurende de hele duur van het experiment onder narcose gehouden waardoor ongerief zo veel mogelijk wordt voorkomen.
Als uit deze studie blijkt dat we door het verkrijgen van ruggenmergvloeistof ook kunnen voorspellen hoe goed de passage van de peptiden is door de bloed-hersenbarrière, kunnen verder studies plaatsvinden zonder dat de dieren ge-euthanaseerd hoeven te worden.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De dieren zijn gedurende de gehele procedure onder narcose, waarna euthanasie plaatsvindt. Gedurende de narcose wordt het welzijn van de dieren bewaakt door ervaren dierenartsen.

Dieren die intraveneus een injectie krijgen en 16-20 uur worden ge-euthanaseerd kunnen niet gedurende de gehele periode onder narcose blijven omdat dit effect heeft op fysiologische parameters en daardoor de resultaten kan beïnvloeden. Anders dan bijkomen uit sedatie worden geen negatieve effecten verwacht en gedurende deze tijd zullen ze geobserveerd worden door de dierverzorgers.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

