

Inventaris Wob-verzoek W21-04		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS20185885	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraagformulier				x		x		x	
2	NTS	x								
3	projectvoorstel			x						
4	Bijlage dierproeven 1			x						
5	Ontvangstbevestiging				x		x			
6	acceptatiebrief				x		x			
7	DEC advies				x		x		x	
8	mailwisseling over aanvulling				x		x			
9	projectvoorstel aangepast			x						
10	bijlage dierproeven aangepast			x						
11	Advies CCD				x		x			x
12	Beschikking en vergunning				x		x			



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, of in de toelichting op de website.
- Of 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 checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 50200 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"> <tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Biomedical Primate Research Centre</td></tr> <tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">10.2.e</td></tr> <tr><td>KvK-nummer</td><td>41146967</td><td></td></tr> <tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Lange Kleiweg</td><td>161</td></tr> <tr><td>Postbus</td><td>3306</td><td></td></tr> <tr><td>Postcode en plaats</td><td>2288 GJ</td><td>Rijswijk</td></tr> <tr><td>IBAN</td><td colspan="2">10.2.g</td></tr> <tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">Stichting Biomedical Primate Research Centre</td></tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Biomedical Primate Research Centre		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e		KvK-nummer	41146967		Straat en huisnummer	Lange Kleiweg	161	Postbus	3306		Postcode en plaats	2288 GJ	Rijswijk	IBAN	10.2.g		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting Biomedical Primate Research Centre	
Naam instelling of organisatie	Biomedical Primate Research Centre																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e																									
KvK-nummer	41146967																									
Straat en huisnummer	Lange Kleiweg	161																								
Postbus	3306																									
Postcode en plaats	2288 GJ	Rijswijk																								
IBAN	10.2.g																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting Biomedical Primate Research Centre																									
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>	<table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>10.2.e</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td>10.2.g</td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>10.2.e</td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling	10.2.g		Telefoonnummer			E-mailadres	10.2.e										
(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie																										
Afdeling	10.2.g																									
Telefoonnummer																										
E-mailadres	10.2.e																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>10.2.g</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>10.2.e</td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	10.2.g		Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres	10.2.e										
(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	10.2.g																									
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres	10.2.e																									
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr> <tr><td>Functie</td><td>10.2.g</td><td></td></tr> <tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>E-mailadres</td><td>10.2.e</td><td></td></tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	10.2.g		Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres	10.2.e										
(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	10.2.g																									
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres	10.2.e																									

- 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
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 10.2.g

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 818 Lege
 Wijziging € 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 10.2.g

Plaats Rijswijk

Datum 7 - 6 - 2018

Handtekening 10.2.e en 10.2.g

1 1 JUN 2018

5885
10.2.g

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



Date June 8, 2018

Our 10.2.g

Your letter



+31.15.284.2761



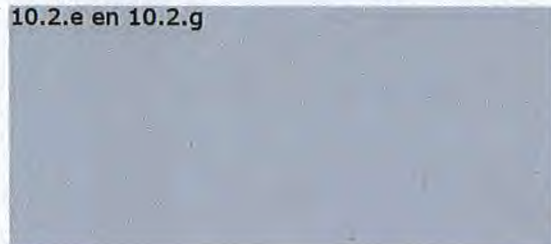
dec@bprc.nl

Subject aanvraag projectvergunning dierproeven administratieve gegevens

Geachte heer/mevrouw,

Hierbij stuur ik u de aanvraag projectvergunning dierproeven, administratieve gegevens, getiteld:
" *Identificatie en isolatie van peptide voor passage door de bloed-hersenbarrière ten behoeve van ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen hersenkanker* ",.

10.2.e en 10.2.g



Bijlagen: 1

10.2.e en 10.2.g





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'. 50200
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Biomedical Primate Research Centre
- 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.

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. Singel-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).

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.

The project consists of 1 study in which bacteriophage pools are passed in different macaques three times.

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'. 50200
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Biomedical Primate Research Centre
- 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).

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 only in-life procedure is 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.

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.

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 project.

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.

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. Additional, animals from previous studies can be used as long as prior treatments did not affect the BBB integrity

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 anesthesia and the animals are euthanized at the end of the procedures. 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?

None

Explain why these effects may emerge.

n.a.

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

n.a.

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').

Non-recovery

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre

10.2.e

Postbus 3306

2288 GJ RIJSWIJK

10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD5020020185885

Bijlagen

2

Datum 11 juni 2018

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 juni 2018. 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". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020185885. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. 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.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

11 juni 2018

Aanvraagnummer:

AVD5020020185885

Datum:
11 juni 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020185885

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50200
Naam instelling of organisatie: Biomedical Primate Research Centre
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 10.2.e
Straat en huisnummer: Lange Kleiweg 161
Postbus: 3306
Postcode en plaats: 2288 GJ RIJSWIJK

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 10.2.e
Functie: 10.2.g
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres: 10.2.e

Datum:
11 juni 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020185885

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 10.2.e
Functie: 10.2.g
Afdeling:
Telefoonnummer: 0
E-mailadres: 10.2.e

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 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: 10.2.e

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 818,-
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: 10.2.g
Plaats: Rijswijk
Datum: 7 juni 2018

Datum:
11 juni 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020185885



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre
10.2.g
Postbus 3306
2288 GJ RIJSWIJK
10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020185885
Bijlagen
2

Datum 11 juni 2018
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 11 juni 2018
Vervaldatum: 11 juli 2018
Factuurnummer: 185885

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5020020185885	€ 818,00

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre
10.2.e
Postbus 3306
2288 GJ RIJSWIJK
10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020185885

Datum
Betreft Vervolg aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 8 juni 2018 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 AVD5020020185885. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 3 augustus 2018 een beslissing. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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.

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: AVD5020020185885
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
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: [REDACTED]
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: 10.2.e [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 11-06-2018
 - aanvraag compleet: 11-06-2018.
 - in vergadering besproken: 18-06-2018
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 19-06 tot 22-06-2018
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 22-06-2018
 - advies aan CCD: 26-06-2018
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De aanvrager heeft het projectvoorstel 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: 20-06-2018
 - Gestelde vraag/vragen: Verduidelijking van de NTS, verduidelijking van technische aspecten en wat tekstuele veranderingen
 - Datum antwoord: 22-06-2018
 - Verstrek(e) antwoord(en): Alle vragen zijn beantwoord en de NTS is verduidelijkt
 - 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 nieuwe aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen onderzoek naar parasitaire pathogenen, 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. Het voorgestelde onderzoek betreft het isoleren van bacteriofagen die eiwitten tot expressie brengen waardoor de bloed-brein barrière (BBB) gepasseerd kan worden. Aangezien de bloed-brein barrière niet *in vitro* nagebootst kan worden, worden de bacteriofagen ingebracht in de

bloedsomloop van een resus aap en geïsoleerd uit de hersenen van dat dier. Na verrijking en vermeerdering van de bacteriofagen die de bloed-brein barrière kunnen passeren wordt dit nog twee keer herhaald. Het aantal dieren is realistisch in geschat op maximaal 12. 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. Nevendooelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorie, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek', sluit aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag wordt met behulp bacteriofagen gezocht naar peptiden die de bloed-brein barrière kunnen passeren. Deze kennis kan mogelijk worden toegepast bij de ontwikkeling van nieuwe medicijnen die hun werking moeten uitoefenen in de hersenen.

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 het project is het identificeren van peptiden die de bloed-brein barrière kunnen passeren. Het uiteindelijke doel is om nieuwe manieren te vinden om glioblastoma en CNS lymphoma beter te kunnen behandelen. Door de nieuw te identificeren peptiden te koppelen aan therapeutische antilichamen, kunnen deze meer gericht op de juiste plek terecht komen en de overlevingskansen van mensen met een hersentumor verhogen. Dezelfde benadering kan ook breder worden toegepast bij de behandeling van andere ziekten waarbij passage van de BBB gewenst is. Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
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.

Voor het onderzoeksveld is het verkrijgen van nieuwe kennis over manieren om de BBB te passeren van groot belang. Deze kennis kan leiden tot betere behandelingsmethoden voor mensen met hersenziektes. Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s).

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen onder narcose gebracht worden waaruit ze niet meer bijkomen.

Voor mensen die getroffen zijn door een hersentumor is het beschikbaar komen van nieuwe effectieve middelen van groot belang. Mensen die deze diagnose horen hebben een kleine kans op genezing.

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. Dezelfde methodiek is succesvol bij muizen toegepast en hieruit is een aantal kandidaten geselecteerd dat de BBB kon passeren (in muizen).
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 er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. Het in de bijlage beschreven experiment is gebaseerd op experimenten met muizen die zeer veelbelovende kandidaten hebben opgeleverd (voor toepassing in muizen). 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. Door de zeer korte duur van dit experiment is dit niet van toepassing

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 op correct als licht ingeschat. De dieren worden onder verdoving gebracht waaruit ze niet meer bij zullen komen. Terwijl de dieren onder verdoving zijn worden bacteriofagen in de bloedbaan gebracht, en zal het dier ~2-3 uur later worden ge-euthanaseerd. De gehele duur van het experiment worden de dieren onder controle gehouden door een dierenarts.
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 besmetten met bacteriofagen. Dieren worden gedurende ~2-3 uur onder narcose gehouden en daarna geperfundeed met spoelvoelstof waarna ze ge-euthanaseerd 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 peptiden die het mogelijk maken de BBB te passeren. De BBB is nog niet in vitro na te bootsen. De beschreven experimenten borduren voort op resultaten behaald in muizen.
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 per infectieronde in drie infectierondes. Dit is gebaseerd op voorgaande experimenten met muizen, waarin de meest actieve hits onafhankelijk in minstens twee dieren gevonden werden. Drie ronden van infectie en amplificatie zijn nodig om voldoende verrijking van de meest potente peptides te krijgen.
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 terminale sedatie die 2-3 uur duurt. Dieren worden gedurende het experiment gemonitord door een ervaren dierenarts. 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, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. De dieren worden gedood tijdens de proef. Dit is nodig omdat de bacteriofagen die de BBB kunnen passeren geïsoleerd moeten worden uit hersenweefsel. 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 vervolgotraject, 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 zoeken naar peptiden die de BBB kunnen passeren 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 waarderen. 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 waarde voor het onderzoeksveld is vooral gelegen in de identificatie van peptiden die als vehikel gekoppeld kunnen worden aan antilichamen om de BBB te passeren. Als de zoektocht succesvol wordt afgerond zal er vervolgonderzoek moeten plaatsvinden, onder andere naar de toepasbaarheid in mensen.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze worden gedurende 2-3 uur onder narcose gehouden alvorens ge-euthanaseerd te worden. De dieren ondervinden hiervan licht ongerief.

De waarden voor de samenleving is vooral gelegen in de identificatie van peptiden die het mogelijk maken de BBB te passeren. Als de zoektocht succesvol wordt afgerond is dit mogelijk een eerste stap in de ontwikkeling van een nieuwe methode voor 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 medicijnen door de BBB heen te kunnen brengen.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door de veelbelovende resultaten die met muizen zijn behaald door een van de partijen waarmee wordt samengewerkt. De onderzoeker en het instituut bezitten de vereiste expertise en voorzieningen voor vergelijkbaar onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor de isolatie van peptiden die potentieel de BBB kunnen passeren is in eerdere experimenten met muizen succesvol gebleken en lijkt een logische benadering. 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 andere proefdieren, 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.

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.

Centrale Commissie Dierproeven (CCD)
10.2.e
Postbus 20401
2500EK Den Haag

Date July 12, 2018

Our ref. 10.2.g Your letter

10.2.e

Subject Antwoorden op vragen van de CCD over 20185885 "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 mevrouw 10.2.e

Ik heb uw verzoek omtrent aanvullende informatie met betrekking tot vergunningaanvraag 20185885 ontvangen. Bijgevoegd vindt u onze antwoorden op uw vragen/opmerkingen. Deze zijn ook verwerkt in de vergunningsaanvraag, waarvan de herziene versie is bijgesloten.

10.2.e en 10.2.g

Bijlage: 1

Antwoorden op opmerkingen/vragen CCD (oorspronkelijk vraag cursief)

In bijlage 3.4.4.1 sectie C staat aangevinkt dat er geen sprake is van hergebruik. Echter, in sectie B wordt omschreven: "Additional, animals from previous studies can be used as long as prior treatments did not affect the BBB integrity." U wordt verzocht de verschillende secties in overeenstemming met elkaar te brengen. Voor veel aanvragers is al dan niet hergebruik van dieren onduidelijk. De CCD wil met de hergebruikvraag in het formulier weten of de dieren voorafgaand aan dit project eerder als proefdier ingezet zijn.

We hebben sectie C aangepast. Hergebruik is aangevinkt en de volgende zin is opgenomen: When available, animals that have been used in previous studies (with maximal moderate discomfort) will be used provided that prior treatments did not affect the BBB integrity. This will only be done after discussion with, and approval by the Institute's Animal Welfare Body.

-In bijlage 3.4.4.1 niks in sectie D betreffende Verfijning omschreven. U wordt verzocht de verfijningsmogelijkheden te omschrijven in deze sectie.

In sectie D betreffende Verfijning is de volgende tekst opgenomen: 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.

-In de NTS wordt het volgende vermeld: "Er wordt wel gewerkt aan muis systemen, maar ook daar ontbreken op dit moment nog de gegevens of deze voldoende voorspellend zijn voor de effecten in een intact dier of de mens". Door deze zin lijkt het of het helemaal niet duidelijk is of dit in niet-humane primaten wel zou kunnen werken. De CCD verwacht dat u dit niet bedoelt te zeggen. Wij verzoeken u om bovenstaande zin anders te formuleren.

In de herziene NTS is de zin nu als volgt geformuleerd: "Er wordt geprobeerd nieuwe muis systemen voor dit type onderzoek op te zetten. Echter, in tegenstelling tot bij de apen, zijn deze op dit moment nog onvoldoende voorspellend voor de effecten in de mens".

10.2.e

Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: woensdag 25 juli 2018 10:50
Aan: 10.2.e
Onderwerp: RE: tav 10.2.e aanvraag AVD5020020185885
Categorieën: Dossier: 10.2.

Beste 10.2.e,

Ik heb de Commissie onderstaande mail voorgelegd. Het is nu duidelijker voor hen hoe de dieren geselecteerd worden. Ze zijn echter van mening dat de selectie van dieren en gebruikte criteria hiervoor toch in het aanvraagformulier (bijlage 3.4.4.1) dient te worden opgenomen/aangepast.

De CCD verzoekt u hierbij geen termen als "when available" te gebruiken omdat deze niet overeenkomen met de strekking uit de e-mail van 18 juli 2018 en om die reden beter vermeden kunnen worden. De commissie stemt uitsluitend in met het gebruik van dieren die al geëuthanaseerd worden omdat ze ongeschikt zijn voor onderzoek of fok.

Wij zien graag de aangepaste aanvraagformulieren tegemoet.

Met vriendelijke groeten,

10.2.e

Van: 10.2.e
Verzonden: woensdag 18 juli 2018 14:56
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: tav 10.2.e aanvraag AVD5020020185885
Urgentie: Hoog

Beste 10.2.e

We hebben vandaag telefonisch gesproken over vergunningaanvraag AVD5020020185885 "Identification, isolation and enrichment of peptides that can pass the blood-brain barrier and be used for the development of new brain cancer therapies" waar nog een vraag was met betrekking tot de selectie van de dieren voor dit project.

Zoals telefonisch besproken zullen we voor dit project alleen dieren selecteren die of al gebruikt zijn in eerdere studies binnen ons instituut (met maximaal matig ongerief) of dieren die op veterinaire of ethische gronden, zoals bijvoorbeeld ernstige chronische diarree of sociaal incompatibel, ge-euthanaseerd moeten worden. Selectie vindt plaats in overleg met de IvD.

Met Vriendelijke Groet,

10.2.e

Betreft: [redacted] 20185885

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

25 Juli 2018

Beste Mevrouw 10.2.e [redacted] Geachte leden van de CCD

Met betrekking tot uw mail van 25 juli 2018 waar u het volgende stelt:

Het is nu duidelijker voor hen hoe de dieren geselecteerd worden. Ze zijn echter van mening dat de selectie van dieren en gebruikte criteria hiervoor toch in het aanvraagformulier (bijlage 3.4.4.1) dient te worden opgenomen/aangepast.

De CCD verzoekt u hierbij geen termen als "when available" te gebruiken omdat deze niet overeenkomen met de strekking uit de e-mail van 18 juli 2018 en om die reden beter vermeden kunnen worden. De commissie stemt uitsluitend in met het gebruik van dieren die al geëuthanaseerd worden omdat ze ongeschikt zijn voor onderzoek of fok.

Hebben we de betreffende bijlage aangepast. De nu opgenomen tekst is:

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.

De aangepaste bijlage is hieronder bijgesloten.



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.

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. Singel-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).

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.

The project consists of 1 study in which bacteriophage pools are passed in different macaques three times.

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'. 50200
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Biomedical Primate Research Centre
- 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).

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 only in-life procedure is 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.

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.

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 project.

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.

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. Additional, animals from previous studies can be used as long as prior treatments did not affect the BBB integrity

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 anesthesia and the animals are euthanized at the end of the procedures. 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?

None

Explain why these effects may emerge.

n.a.

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

n.a.

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').

Non-recovery

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



Advies aan CCD

Datum 26 juli 2018
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20185885

Instelling: Biomedical Primate Research Centre
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
Aanvraagnummer: AVD20185885
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Translatieel of toegepast onderzoek

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

Proces	<p>De aanvraag is ingediend zonder advies van de DEC. Er is advies gevraagd aan de DEC welke door de aanvrager als voorkeur was aangegeven.</p> <p>Het Secretariaat heeft bij de behandeling van het dossier de volgende vragen gesteld aan de aanvrager:</p> <p>-In bijlage 3.4.4.1 sectie C staat aangevinkt dat er geen sprake is van hergebruik. Echter, in sectie B wordt omschreven: "Additional, animals from previous studies can be used as long as prior treatments did not affect the BBB integrity." U wordt verzocht de verschillende secties in overeenstemming met elkaar te brengen.</p> <p>Voor veel aanvragers is al dan niet hergebruik van dieren onduidelijk. De CCD wil met de hergebruikvraag in het formulier weten of de dieren voorafgaand aan dit project eerder als proefdier ingezet zijn.</p> <p>-In bijlage 3.4.4.1 niks in sectie D betreffende Verfijning omschreven. U wordt verzocht de verfijnings-mogelijkheden te omschrijven in deze sectie.</p> <p>-In de NTS wordt het volgende vermeld: "Er wordt wel gewerkt aan muis systemen, maar ook daar ontbreken op dit moment nog de gegevens of deze voldoende voorspellend zijn voor de effecten in een intact dier of de mens". Door deze zin lijkt het of het helemaal niet duidelijk is of dit in niet-humane primaten wel zou kunnen werken. De CCD verwacht dat u dit niet bedoelt te zeggen. Wij verzoeken u om bovenstaande zin anders te formuleren.</p>
---------------	---

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		12	Niet menselijke primaten

Keuze diersoort CITATEN:

"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."

"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."

Aantal dieren CITAAT:

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 project.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
Maatschappij	11.1

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Diersoort CITAAT: 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.</p> <p>Hergebruik CITAAT: 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.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: CITAAT: 1. Rechtvaardigt het zoeken naar peptiden die de BBB kunnen passeren 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 waarde voor het onderzoeksveld is vooral gelegen in de identificatie van peptiden die als vehikel gekoppeld kunnen worden aan antilichamen om de BBB te passeren. Als de zoektocht succesvol wordt afgerond zal er vervolgonderzoek moeten plaatsvinden, onder andere naar de toepasbaarheid in mensen.</p> <p>Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze worden gedurende 2-3 uur onder narcose gehouden alvorens ge-euthanaseerd te worden. De dieren ondervinden hiervan licht ongerief.</p> <p>De waarden voor de samenleving is vooral gelegen in de identificatie van peptiden die het mogelijk maken de BBB te passeren. Als de zoektocht succesvol wordt afgerond is dit mogelijk een eerste stap in de</p>
-------------------	--

ontwikkeling van een nieuwe methode voor 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 medicijnen door de BBB heen te kunnen brengen.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door de veelbelovende resultaten die met muizen zijn behaald door een van de partijen waarmee wordt samengewerkt. De onderzoeker en het instituut bezitten de vereiste expertise en voorzieningen voor vergelijkbaar onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor de isolatie van peptiden die potentieel de BBB kunnen passeren is in eerdere experimenten met muizen succesvol gebleken en lijkt een logische benadering. 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 andere proefdieren, 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.

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

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij
- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

CITAAT:

Verduidelijking van de NTS, verduidelijking van technische aspecten en wat tekstuele veranderingen.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

- Het DEC advies is helder en navolgbaar.
- In het DEC advies is 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.
- U geeft in het advies aan waarop de keuze van de aanvrager voor het gebruik van niet-humane primaten is gebaseerd. De CCD mist de weging van de gekozen diersoort in het advies.

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	CITAAT: 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.
Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	CITAAT: 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.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>De DEC zegt hierover het volgende:</p> <p>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. Dezelfde methodiek is succesvol bij muizen toegepast en hieruit is een aantal kandidaten geselecteerd dat de BBB kon passeren (in muizen).</p> <p>11.1</p>
--	---

3V's

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

Verfijnen	
	3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides: geen verfijning omschreven.
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.

Naam proef		
3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides	HEP: Worden niet verwacht	
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Terminaal	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Er is sprake van hergebruik omdat dieren van een eerdere studie ingezet kunnen worden voor deze terminale studie. Een voorwaarde is dat de BBB integriteit niet is aangetast in de eerdere studie.

De aanvrager geeft aan dat in eerste instantie 6 dieren gebruikt gaan worden in de BBB-studie. Indien nieuwe transporters worden geïdentificeerd wil de aanvrager tot een maximum van 12 dieren gebruiken voor de studie. De aanvrager zal in dit geval vooraf met de IvD hierover overleggen.

nemen.

Omdat de aanvraag een studie met niet-humane primaten betreft is een beoordeling achteraf noodzakelijk. 5.2 lid1

De aanvrager wordt gevraagd om Secties C en D van bijlage 3.4.4.1 aan te passen/vullen en een aanpassing in de NTS te verwerken.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat 5.2 lid1

Het Secretariaat adviseert 5.2 lid1

Voorstel is om 5.2 lid1

Hierbij stelt het Secretariaat voor de volgende voorwaarden te stellen:

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

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. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 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.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre

10.2.e

Postbus 3306

2288 GJ RIJSWIJK

10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD5020020185885

Bijlagen

1

Datum 26 juli 2018

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e,

Op 8 juni 2018 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 AVD5020020185885. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2018 tot en met 31 juli 2021.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Dit advies is ontvangen op 26 juni 2018. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:
26 juli 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020185885

Nadere vragen aanvrager

Op 11 juli 2018 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op het hergebruik en de criteria voor selectie van dieren. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

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 zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d van de wet. 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 20401, 2500 EK 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. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Datum:

26 juli 2018

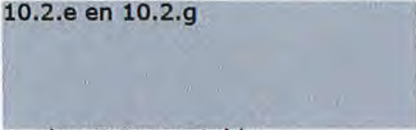
Aanvraagnummer:

AVD5020020185885

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

i.o.

10.2.e en 10.2.g



drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Biomedical Primate Research Centre
Adres: Postbus 3306
Postcode en plaats: 2288 GJ RIJSWIJK
Deelnemersnummer: 50200

deze 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 AVD5020020185885, volgens advies van Dierexperimentencommissie .

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 8 juni 2018
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 12 juli 2018;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Injection of bacteriophage libraries and identification and isolation of receptor binding peptides, zoals ontvangen op 25 juli 2018;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 12 juli 2018;
 - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 26 juni 2018
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 12 juli 2018.

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

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

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. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Aanvraagnummer:

AVD5020020185885

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 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:

AVD5020020185885

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. Uit artikel 10b 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 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft 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 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:

AVD5020020185885

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 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 13d 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 13c 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.

Levensloofdossier

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

Niet-menselijke primaten

De Minister heeft een ontheffing verleend volgens artikel 10e lid 7, die het gebruik van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige

Aanvraagnummer:
AVD5020020185885

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