

	Inventaris Wob-verzoek W16-10S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016418								
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	
11	Mail beschikking 14-3-2016				x		x		
12	Mail terugkoppeling DEC 14-3-2016				x		x	x	

11 FEB. 2016

AVD 103002016418



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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?

Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300

☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde

KvK-nummer 4 1 0 5 5 6 2 9

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

Straat en huisnummer Geert Groteplein 10

Postbus 9101, t.a.v.

Postcode en plaats 6500HB Nijmegen

IBAN NL90ABNA0231209983

Tenaamstelling van het rekeningnummer UMC St Radboud

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters ☐ Dhr. ☒ Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

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

(Titel) Naam en voorletters ☒ Dhr. ☐ Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters ☐ Dhr. ☐ Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- ☒ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- ☐ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- ☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- ☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- 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 09_03_2016
- Einddatum 09_03_2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het evalueren van een potentieel nieuw geneesmiddel voor de behandeling van Parkinson
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
- E-mailadres dierexperimentencommissie@radboudumc.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.441,00 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
- ☒ DEC-advies, factuurgegevens

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 1.6). 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.

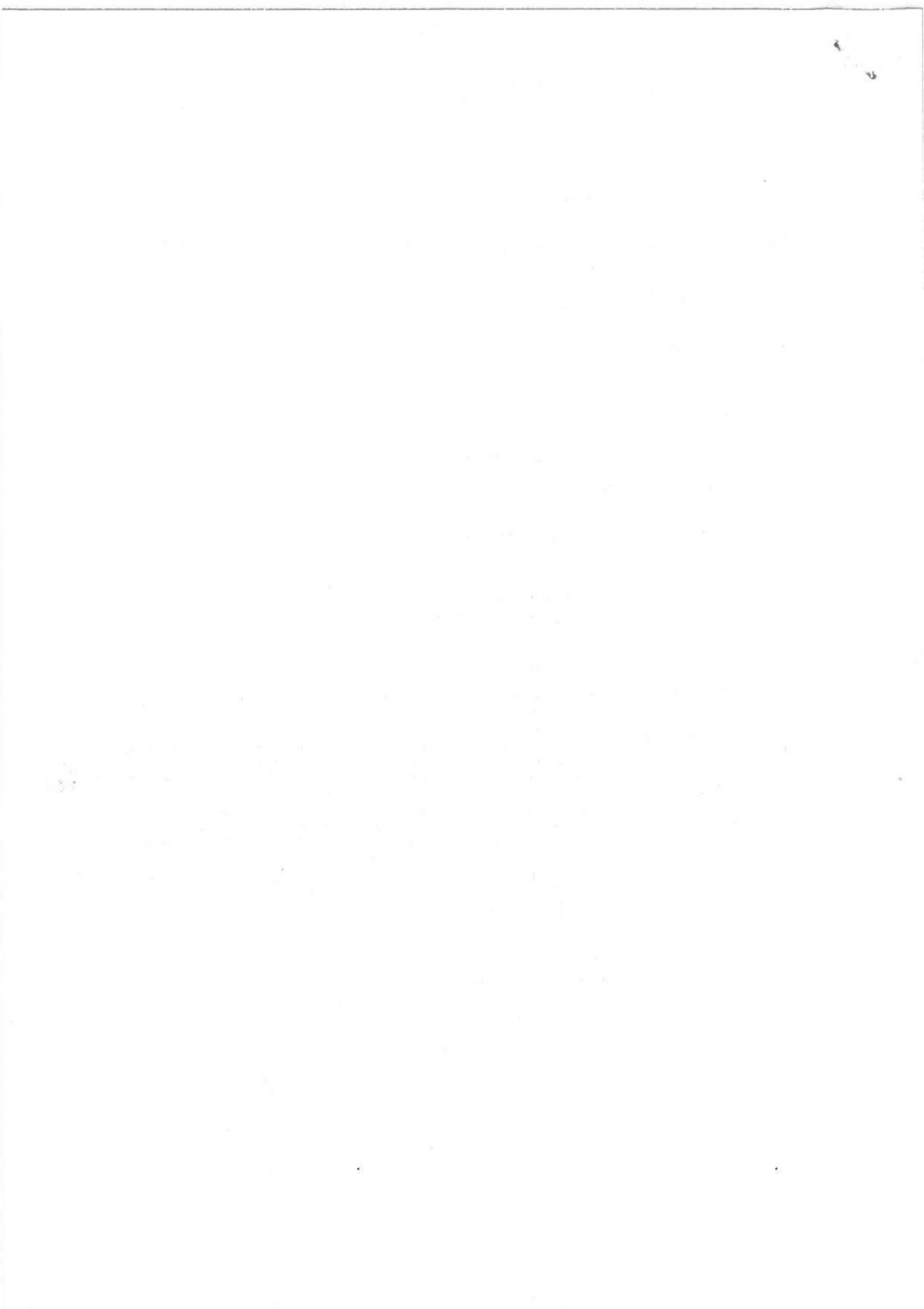
Naam 

Functie 

Plaats Nijmegen

Datum 09 - 02 - 2016

Handtekening 



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of 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'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease

2 Categories

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

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurological disorder that is increasingly prevalent with age, with the incidence rising from approximately 4 people per 10,000 in their forties to 2 in 100 over the age of eighty. Major PD characteristics are tremor, slowness of movement, rigidity, postural instability, abnormal gait and loss of dopaminergic neurons in substantia nigra.

Current evidence from postmortem human brain tissue, genetic- and toxin- induced animal and cellular models indicate a central role of mitochondrial dysfunction, leading to a cellular redox imbalance and increased oxidative stress, which has been conclusively established as a common denominator for a significant subset of monogenic and idiopathic forms of PD (1). Mutation in at least 7 genes (ATP13A2, DJ-1, LRRK2, Parkin, PINK1, SNCA, VSP35) are known to underlie monogenic PD, most of them encode proteins that impact mitochondrial function and clearance, cellular oxidative stress and redox balance (2, 3).

Mutations in DJ-1 and PINK1 genes have been associated with mitochondrial dysfunction and oxidative stress in different models of PD (3, 4-10). The protein encoded by the PINK1 gene is a serine-threonine kinase, which has been suggested to provide protection against oxidative stress by assisting in condemning damaged mitochondria to degradation/mitophagy and maintaining mitochondrial homeostasis (11). The exact function of the DJ-1 protein have not been fully elucidated, it is thought to serve as a sensor of oxidative stress switching its isoelectric point to a more acidic form following oxidative stress (12).

Recently, novel rat knockout (KO) models of DJ-1 and PINK1 genes were generated and characterized (4, 13-15). In contrast to mice, the loss of either DJ-1 gene or PINK1 gene in rats result in a marked behavioral dysfunction and significant loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, both major characteristics of PD (8, 13-15). DJ-1 and PINK1 KO rats display significant reduced rearing frequency, impaired hindlimb strength and abnormal gait (13). PINK1 (but not DJ-1) showed decreased total distance moved in the open field and increased foot slips measured by the tapered balance beam test (13). Tremor was not seen in both KO rat models. Both KO rat models show 2-3 fold increase in striatal neurotransmitters dopamine and serotonin at the age of 8 months (13). Mutations in the DJ-1 and PINK1 genes both in patients and KO rat models are characterized by early age of onset. Currently, limited information is reported about the neuropathology in patients with the PINK1 and DJ-1 gene mutations. These findings support the use of the DJ-1 and PINK1 KO rat models as relevant models for evaluating therapeutic efficacy of novel treatment strategies for PD. To date, no pharmacological intervention studies in these genetic rat models are described.

Currently, there is no cure for PD. Multiple agents have been studied, designed to assess disease modification in PD, however they all have failed in clinical trials (16). Over the last 3 years, clinical trials investigating the potential of adeno-associated virus serotype 2 (AAV)-neuturin, coenzyme Q10, creatine, pramipexole, and pioglitazone reported negative findings or futility (16). Continuous progress has been made by expanding the understanding of molecular pathways involved in PD to reveal new targets, and by developing novel animal models of PD for preclinical studies such as the DJ-1 and PINK1 KO rats.

The present project aims at evaluating the therapeutic potential of KH176 in DJ-1 and PINK1 KO rat models. KH176 is a clinical-stage (phase 1 successfully completed) new chemical entity, the frontrunner compound developed by a spin-off bio pharmaceutical company of the Radboud UMC Nijmegen. KH176 acts as an intracellular redox-modulating agent targeting oxidative stress. Recently, our research proposal aiming at the evaluation of KH176, as a potential therapeutic for PD, has been awarded by the Michael J. Fox Foundation (Therapeutic Pipeline Program 2015). KH176 has shown proof of efficacy in preclinical models of mitochondrial disease (in vitro and in vivo) (manuscript in preparation) and PD (in vitro) and has obtained designated orphan status in the EU (EMA) for "treatment of Leigh syndrome" (EMA/OD/068/14) and in the USA (FDA) for "treatment of inherited mitochondrial respiratory chain diseases". KH176 has already been synthesized in a GMP batch required for clinical development and has proven to be highly tolerable during the 28 days regulatory toxicology study in two animal species (rats and dogs). The first-in-man phase 1 clinical trial (Eudra 2015-001717-26) for mitochondrial disease is recently completed.

We hypothesize that KH176 will act as a neuroprotective agent by restoring or preventing the cellular redox imbalance, particularly in dopaminergic neurons, and ultimately prevent and/or delay the manifestation of PD. KH176 is both a free-radical scavenger and redox modulator. Many free radicals scavenging antioxidants have shown only little benefits in human diseases including PD. Free radicals are short-lived molecules produced by specific enzymes at specific localization and compartmentalization in the cells, therefore free radical scavengers will differ in their efficacy depending on their targeting. Indeed, to be able to scavenge free-radicals the antioxidants must be in close vicinity to the specific enzyme responsible for their production. KH176 has been shown to efficiently scavenge cellular free-radicals such as superoxide while many other known antioxidants were unable to do so. In addition, KH176 is a co-factor of an enzyme involved in the control of the cellular redox balance leading to the protection of cells against oxidative stress burden (confidential data).

1. Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO journal*. 2012;31(14):3038-62.
2. Verstraeten A, Theuns J, Van Broeckhoven C. Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends in genetics* : TIG. 2015;31(3):140-9.
3. Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature clinical practice Neurology*. 2008;4(11):600-9.
4. Villeneuve LM, Purnell PR, Boska MD, Fox HS. Early Expression of Parkinson's Disease-Related Mitochondrial Abnormalities in PINK1 Knockout Rats. *Molecular neurobiology*. 2014.
5. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 2003;299(5604):256-9.
6. Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H. Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;312(4):1342-8.
7. Park J, Kim SY, Cha GH, Lee SB, Kim S, Chung J. Drosophila DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene*. 2005;361:133-9.
8. Meulener M, Whitworth AJ, Armstrong-Gold CE, Rizzu P, Heutink P, Wes PD, et al. Drosophila DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins associated with Parkinson's disease. *Current biology* : CB. 2005;15(17):1572-7.

9. Hoepken HH, Gispert S, Morales B, Wingerter O, Del Turco D, Mulsch A, et al. Mitochondrial dysfunction, peroxidation damage and changes in glutathione metabolism in PARK6. *Neurobiology of disease*. 2007;25(2):401-11.
10. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, et al. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*. 2006;441(7097):1162-6.
11. Springer W, Kahle PJ. Regulation of PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Autophagy* 2011;(7): 266-278.
12. Mitsumoto A, Nakagawa Y. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic. Res.* 2001; (35): 885-893.
13. Dave KD, De Silva S, Sheth NP, Ramboz S, Beck MJ, Quang C, et al. Phenotypic characterization of recessive gene knockout rat models of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*. 2014;70:190-203.
14. Sun J, Kouranova E, Cui X, Mach RH, Xu J. Regulation of dopamine presynaptic markers and receptors in the striatum of DJ-1 and Pink1 knockout rats. *Neuroscience letters*. 2013;557 Pt B:123-8.
15. Baptista MA, Dave KD, Sheth NP, De Silva SN, Carlson KM, Aziz YN, et al. A strategy for the generation, characterization and distribution of animal models by The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research. *Disease models & mechanisms*. 2013;6(6):1316-24.
16. Kalia LV, Kalia SK, Lang AE. Disease-modifying strategies for Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2015.

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 aim of this project is to evaluate the therapeutic potential of KH176, a new chemical entity, on Parkinson's Disease (PD) phenotype in PD animal models. We predict to find marked disease modifying therapeutic effects on one or more outcome measures.

We believe the work within this project can be achieved within the five-year period. Our collaboration with the Parkinson Center Nijmegen (ParC), will strengthen us in the Parkinson research field. Expertise concerning the behavioral studies such as the CatWalk gait analysis is present within our institute. Furthermore, collaboration with the Donders Institute will provide sufficient support and expertise for the microdialysis study. The DJ-1 and PINK1 KO rats are commercially available. The compound KH176 is available. Previous work showed proof of efficacy of KH176 in preclinical models of MD (in vitro and in vivo) (manuscript in preparation) and PD (in vitro).

3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

Our experiments will help us in the development of successful new therapeutics for Parkinson's Disease (PD) with underlying mitochondrial dysfunction.

Furthermore, the experiments will give new insight in the oxidative stress level and redox balance in blood and brain in the DJ-1 and PINK1 KO rat models compared to wildtype rats. Although, these models are well defined in the literature, this information is still lacking and will be helpful in the understanding of the pathology of PD.

Social relevance:

PD is a progressive neurological disorder that is increasingly prevalent with age, with the incidence rising from approximately 4 people per 10,000 in their forties to 2 in 100 over the age of eighty. Multiple agents have been studied, designed to assess disease modification in PD, however they all have failed in clinical trials. Therefore, there is a unmet need for the development of clinical effective treatments for PD.

3.4 Research Strategy

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

The overall research strategy is depicted in the flow chart below.

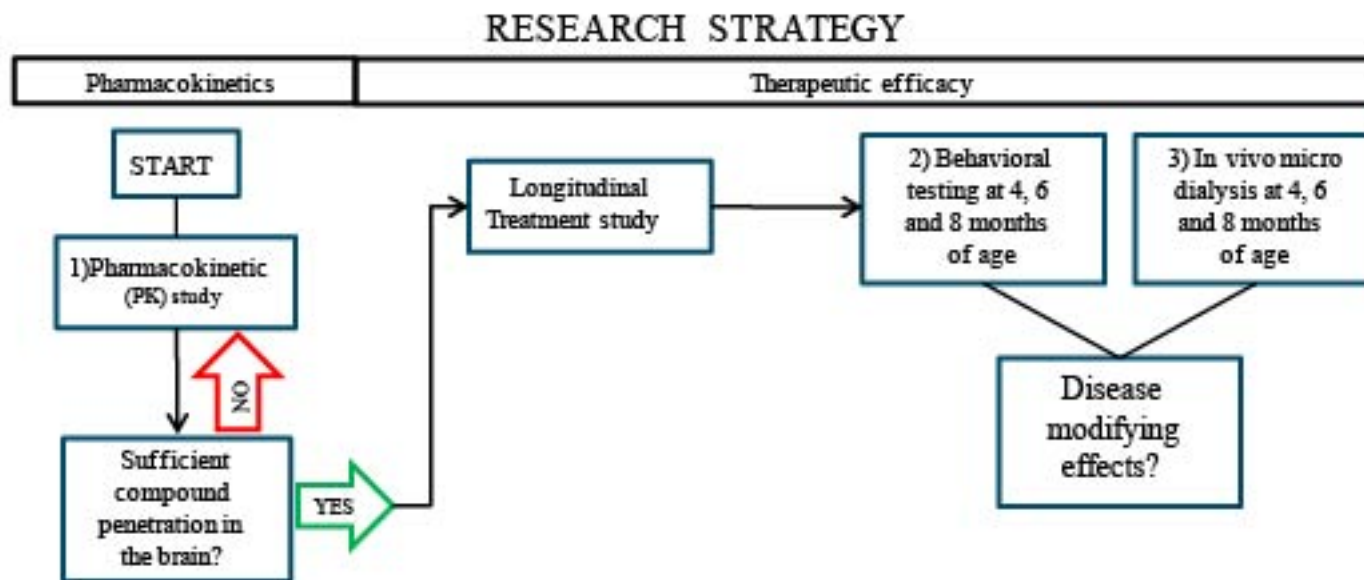
1) Dose selection study: to optimize the dosing and administration scheme

Longitudinal treatment studies:

2) Behavioral study: to test the therapeutic efficacy on behavioral outcome measures

3) Microdialysis study: to test the therapeutic efficacy on neurotransmitters and oxidative stress measures in the brain at different time points in the same animal

After successful completion of the dose selection study, the behavioral- and microdialysis study will be performed simultaneously. Since the implantation of the microdialysis probe will influence the animal behavior, two separate studies will be conducted. The compound can have an effect on outcome measures of either one of the two or both studies.



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.

Animals used in each study (DJ-1, PINK1 and WT rats) will be bred. The genetically altered animals will have a PD phenotype, so the breeding will be considered with discomfort and is included in this proposal.

1) Dose selection study

The experimental set-up for this study is depicted below.

A) To reduce animal discomfort, oral administration (via food pellets) is preferred for the long term treatment studies. In the literature no information is given on significant differences in food intake between the DJ-1, PINK1 and WT rats, therefore we will measure the baseline food intake levels in all 3 animal groups for 7 days.

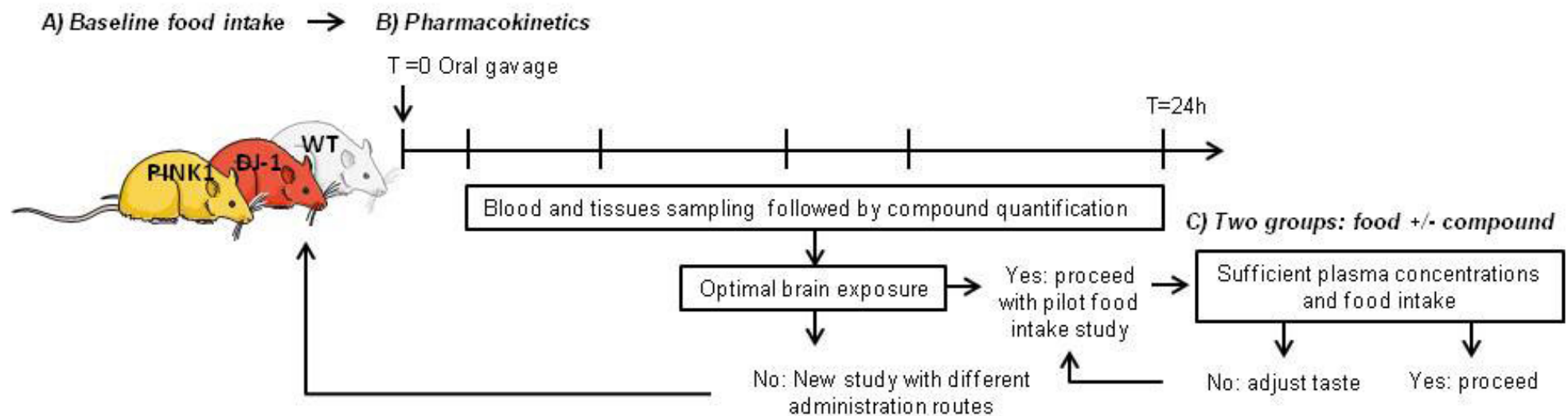
B) Since the pharmacokinetics (PK) may differ in the KO rat models compared to WT, this study will be performed in all three animal groups. After a single oral gavage at the starting time point (T=0), compound concentrations (in blood and tissue) will be evaluated at 5 different time points (latest time point is maximal 24 hours). Half life of the compound is the most important outcome and by experience of previous PK studies with KH176 in

rats we know that 5 time points will give a reliable measurement. Previous work has shown beneficial effects of KH176 on motor behavior (CatWalk and Rotarod) in mitochondrial complex I deficient (Ndufs4^{-/-}) mice. The related brain concentrations that we know from these mice studies will be used as an indicator whether optimal brain exposure is reached.

C) If optimal brain exposure is reached, a pilot study for food intake will be performed to rule out a potential specific taste of the compound which can influence food intake in the treatment group versus vehicle group. The compound will be mixed with grinded food pellets and administrated for 7 days. Food intake and compound concentration in blood and tissue (brain) will be used as outcome measures.

If oral administration is not resulting in a sufficient compound uptake (B), other administration routes will be considered (osmotic minipumps) and there will be no need to perform the pilot study (C).

1) Dose selection study

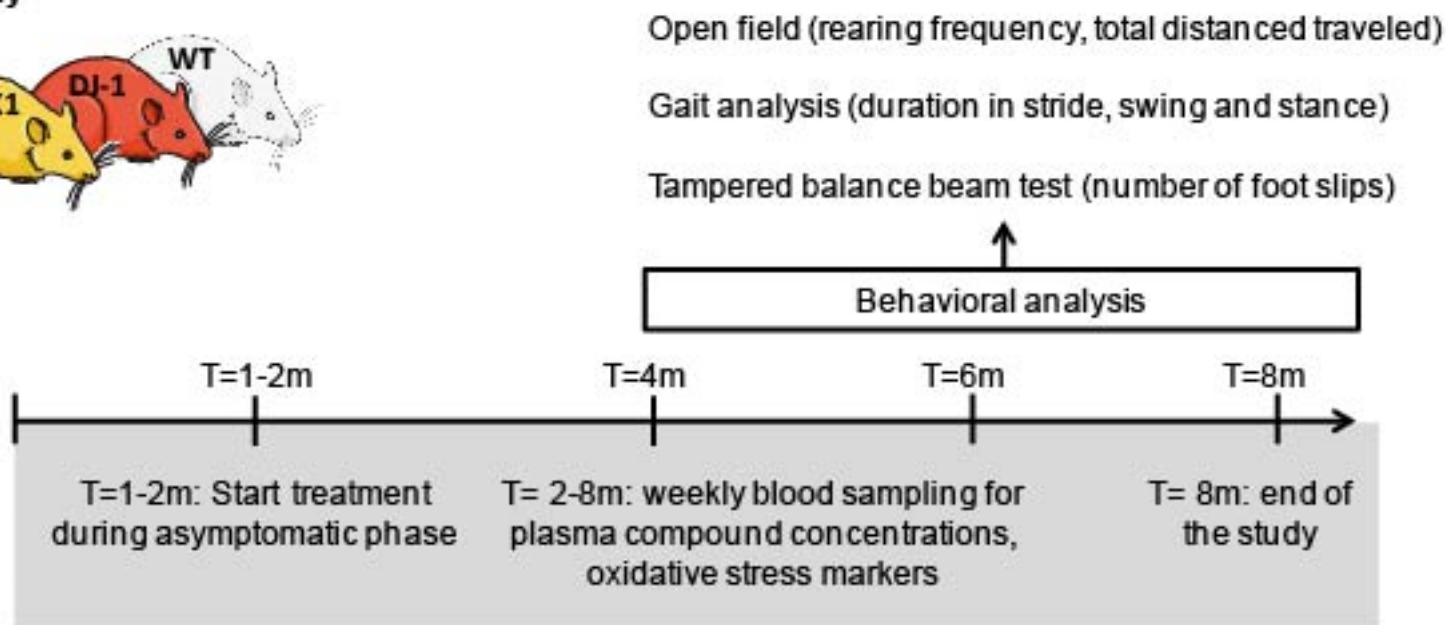


2) Behavioral study

Using WT, PINK1 and DJ-1 rats, long-term treatment will start during the asymptomatic phase at the age of 1-2 months, and preferably administrated via solid food pellets. To control for compound intake, body weight will be monitored daily and blood samples will be taken weekly to measure plasma concentrations. A significant decrease in the body weight of an animal or an insufficient plasma concentration will lead to the

exclusion of the animal from the study. The therapeutic effect of the compound will be evaluated on the following behavioral outcome measures at 4, 6 and 8 months of age, 1) mobility in open field (distance moved in cm), 2) rearing frequency, 3) gait abnormalities on CatWalk (duration in stride, swing and stance and 4) tapered balance beam performance (number of footslips).

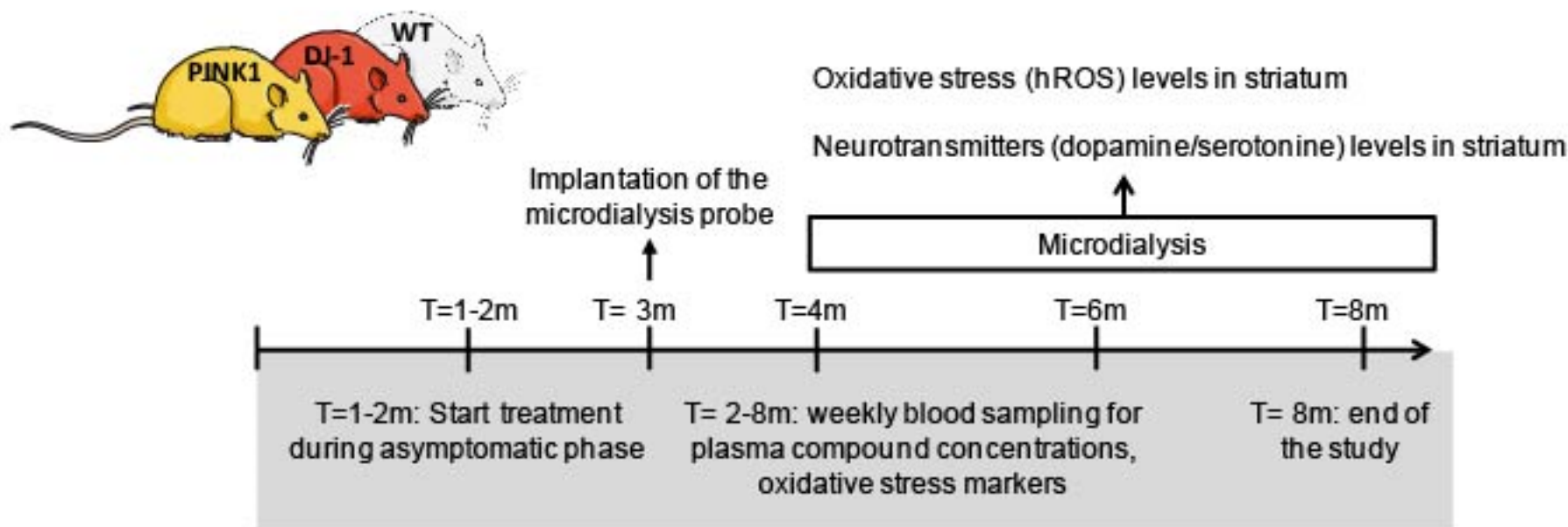
2) Behavioral study



3) Microdialysis

Using WT, PINK1 and DJ-1 rats, long-term treatment will start during the asymptomatic phase at the age of 1-2 months, and preferably administrated via solid food pellets. To control for compound intake, body weight will be monitored daily and blood samples will be taken weekly to measure plasma concentrations. A significant decrease in the body weight of an animal or an insufficient plasma concentration will lead to the exclusion of the animal from the study. All rats will be implanted with a guide cannula in the brain under isoflurane anesthesia at the age of 3 months. After a recovery period of at least 7 days, a microdialysis probe is inserted into the guide cannula to measure the extracellular levels of oxidative stress (hROS) and neurotransmitters using high-performance liquid chromatography equipment which is coupled to an electrochemical detector. Microdialysis will be performed at 4, 6 and 8 months of age. By using this method instead of sacrificing animals at each time point for immunohistochemistry, we will reduce the number of animals and also we have measurements at different time points within the same animal.

3) Microdialysis study



Note: More detailed information about the animal procedures can be found in appendix 3 of the animal procedures.

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

This project will provide vital information on the pharmacokinetics (PK) and therapeutic efficacy of KH176 in the DJ-1 and PINK1 KO rat models for Parkinson's disease (PD). The dose selection study is necessary for optimization of the dose and administration route of the compound, which will be used for the behavioral and microdialysis studies. Importantly, the dose selection study will be used to test whether the compound is able to penetrate the main target organ (the brain) sufficiently. If this is not the case, we will not proceed with this compound in the behavioral and microdialysis study.

The behavioral study will indicate whether the compound has beneficial therapeutic effects on different behavioral outcomes. Microdialysis will reveal the effect of the compound on the possible prevention or delay of the loss of dopaminergic neurons in the brain. Furthermore, the oxidative stress levels and redox balance in the brain will give us information about the target engagement of the compound. Combining these results will give insight in the relationship between the compound, behavior and neurochemical/redox changes in the brain.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Dose selection study
2	Longterm-Behavioral study
3	Longterm treatment-Microdialysis study

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

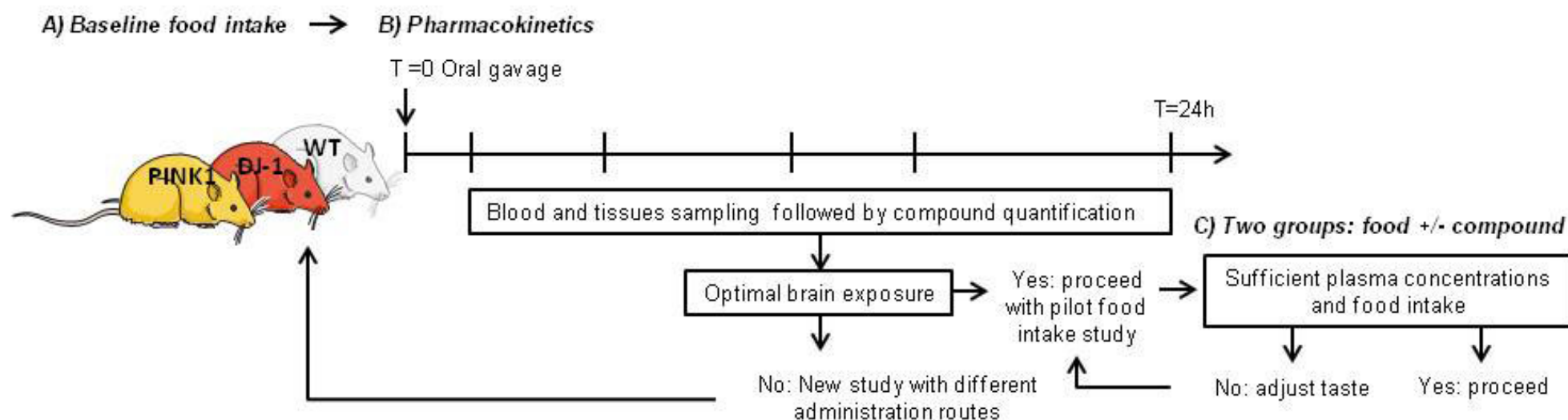
1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Dose selection study

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.

1) Dose selection study



1) Dose selection study

The first part of the project will focus on the optimization of the dosing scheme (route, concentration) that will be used for the long-term treatment. Importantly, this study will be used to test whether the compound is able to penetrate the main target organ (the brain) sufficiently. If this is not the case, we will not proceed with this compound in the behavioral and microdialysis study. Animals used in this study (DJ-1, PINK1 and WT rats) will be bred. The genetically altered animals will have a PD phenotype, so the breeding will be considered with discomfort.

A) To reduce animal discomfort, oral administration (via food pellets) is preferred for the long term treatment studies. In the literature no information is given on significant differences in food intake between the DJ-1, PINK1 and WT rats, therefore we will measure the baseline food intake levels in all 3 animal groups for 7 days (5 animals per group).

B) Pharmacokinetics may differ between DJ-1, PINK1 and WT rats, therefore we will perform this study in all three animal groups. After a single administration of the compound by oral gavage at the starting time point (T=0), compound concentrations will be evaluated at 5 different time points (latest time point is maximal 24 hours). Half life of the compound is the most important outcome. To minimize the number of animals, we know by our experience of previous PK studies with KH176 in rats that 5 time points will give a reliable measurement. At each time point, 5 animals will be sacrificed for compound measurements in blood and tissue. Previous work has shown beneficial effects of KH176 on motor behavior (CatWalk and Rotarod) in mitochondrial complex I deficient (Ndufs4^{-/-}) mice. The related brain concentrations that we know from these mice studies will be used as an indicator whether optimal brain exposure is reached.

- outcome parameters:

compound concentration in brain

compound concentration in plasma

adverse effects of the compound (unexpected changes in the animal's behavior e.g. no self-grooming or no food/water intake, when the animal does not respond to a stimulus anymore)

C) If optimal brain exposure is reached after oral administration, and no adverse effects are noted, a pilot study for food intake will be performed to rule out a potential specific taste of the compound which can influence food intake in the treatment group versus vehicle group. The compound will be mixed with grinded food pellets and administrated for 7 days.

- outcome parameters:

food intake

plasma compound concentration

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

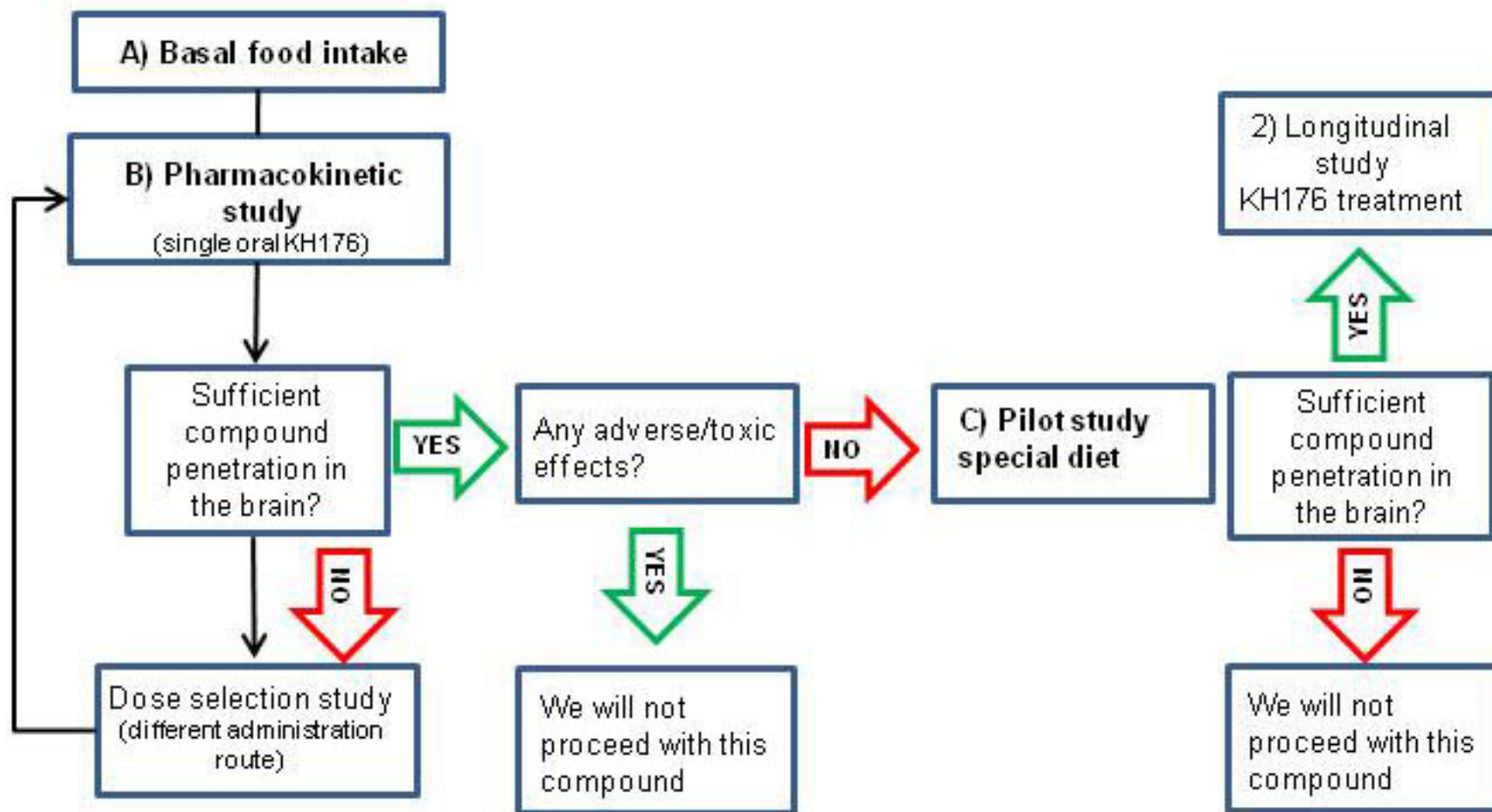
The proposed procedures for this study are the following:

- 1) Breeding pairs of DJ-1^{-/-}, PINK1^{-/-} and Long Evans Hooded (LH) rats will be ordered by Sage Labs. The LH rat is the background strain of the DJ-1 and PINK1 rats and considered as wildtype. For breeding, males and females will be paired, under normal housing conditions in our animal facility.
- 2) Measurement of baseline food intake levels of DJ-1, PINK1 and WT rats for 7 days.
- 3) DJ-1, PINK1 and WT rats will receive a single administration of the compound via oral gavage (procedure duration is 1-2min).
- 4) At 5 different time points, the latest of which will be 24 h post administration, rats will be placed under isoflurane anesthesia (procedure duration

is 2-3 min), blood will be collected via a heart puncture, followed by euthanasia. Brains and other tissues will be collected for the quantification of compound levels.

5) For the pilot study on administration through food pellets, DJ-1, PINK1 and WT rats will be fed special food with or without the compound for 7 consecutive days. Body weight and food intake will be monitored daily and at the end of the 7 days blood samples will be collected to measure plasma compound concentrations and the animals will be euthanized.

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



First baseline food intake levels will be measured in DJ-1, PINK1 and WT rats (n=5 per group) for 7 days.

A) Baseline food intake: 5 animals X 3 animal groups = 15 animals

Primary outcome of the PK study is to demonstrate what the systemic exposure (plasma) and tissue exposure (brain) is, following preferably oral administration or other administration routes. Based on pilot studies and prior pharmacokinetic studies reported in our group, 5 animals per time point are needed. To give sufficient information about the uptake of the compound in time, for each compound, 5 time points will be used.

B) PK oral gavage: 5 animals X 5 time points X 3 animal groups X 2 different doses = 150 animals

The results of the PK study with oral gavage will indicate whether oral administration is possible and what dose is resulting in sufficient tissue exposure. If oral administration is possible, the pilot food intake study will be performed to distinguish any effects of the compound on food intake, an estimated group size of 5 animals for each of the two groups (vehicle, compound) will be used. Variation in food intake in animals having similar age and body weight will be minimal, therefore we estimate 5 animals per group will be sufficient to indicate any positive or negative effects. This will only be performed for one dose.

C) Pilot food intake: 5 animals X 2 groups X 3 animal groups = 30 animals

If based on the PK study, oral administration is not resulting in a sufficient tissue exposure (brain), we will not proceed with the pilot food intake (C) but will repeat the PK study (B) with a different administration route (osmotic minipump).

B) PK osmotic minipump: 5 animals X 5 time points X 3 animal groups X 2 different doses = 150 animals

Total 15 + 150 + 30 + 150 = 345 animals (115 per animal group)

Breeding information for each animal group:

Mean number of 8 pups per litter

Ratio male/female is 50/50

Breeding success of 80%

DJ-1: 20 breeding pairs, gives 16 expected litters X 8 pups = 128 pups

To be registered: 40 DJ-1 breeding animals + 128 pups = 168 rats

PINK1: 20 breeding pairs, gives 16 expected litters X 8 pups = 128 pups

To be registered: 40 PINK1 breeding animals + 128 pups = 168 rats

WT: 20 breeding pairs, gives 16 expected litters X 8 pups = 128 pups

To be registered: 115 pups used in the experiment.

Grand total: 168 DJ-1 + 168 PINK1 + 115 WT rats = 451 rats

B. The animals

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

In the literature no information is given on significant differences in food intake between the DJ-1, PINK1 and wildtype (WT) rats, therefore we will measure the baseline food intake levels in all 3 animal groups for 7 days.

For this study we will use adult wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats. The background strain of the DJ-1 and PINK1 KO rats is the Long Evans Hooded rat (from [REDACTED], so this strain is considered as wildtype. Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	own breeding	451	adult and pup

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.

Replacement:

The described study concerns with assessing the pharmacokinetics (PK) of KH176 *in vivo*, in order to design adequate dosing regimens for the behavioral and microdialysis studies. It is not possible to obtain the required pharmacokinetic information solely on the basis of *in vitro* studies.

Specific *in vivo* factors will have impact on the disposition of compounds, for which currently no adequate *in vitro* or *in silico* prediction tools are available and hence cannot be anticipated on without doing *in vivo* PK studies. Examples of such factors encompass perfusion of different organs, involvement of transporters and drug metabolizing enzymes for which no good *in vitro* systems are available (particularly to quantitatively account for differences in membrane expression of transport proteins/ drug metabolizing enzymes between the *in vitro* test systems and the *in vivo* situation).

Reduction:

Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study. We are using the absolute minimum number of animals necessary to still be able to discover potentially statistical significant differences between the various genotypes and/or treatment. Using even less animals leads to an increase of the standard error of mean (sem), thereby reducing the statistical power. By using selection criteria and go/ no go points in our dose selection study, the number of animals used in the behavioral and microdialysis studies will be reduced.

Refinement:

This study is necessary to optimize the dosing scheme and administration route of KH176, which will be used in the following long term treatment studies. To minimize the animals discomfort in the long term treatment studies, we are aiming on an oral administration via food pellets.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available. Animals will be group housed. Skilled personnel will perform the animal procedures. After administration, the animal's condition will be monitored until the end of the study. At the different time points animals will be sacrificed by performing a heart puncture under isoflurane anesthesia.

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.

non-applicable

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.

H. Pain and pain relief

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

Animals may experience pain during the administration of the compound. However, compound administration itself is not associated with a degree of pain that requires the use of analgesics. By using skilled personnel and previous handling of the animals, the discomfort will be minimized. At the end of the study the animals will be sacrificed by heart puncture under isoflurane anesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Possible types of discomfort occurring in this study:

- Stress (mild)
- Single injection causing pain and stress (mild)
- Administration of anesthesia (euthanization) (non-recovery)
- Discomfort due to the PD phenotype (mild)

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the handling of the animals and oral gavage.

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

To prevent stress, animals will be grouped housed during the study and previously handled. Administration of the compound will be carried out by experienced researchers. No side-effects/toxicity of KH176 are expected. No pharmacological induction of pain/toxicity was observed with KH176 in previous experiments (DEC 2013-210).

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.

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one of the following humane endpoints is reached:

- unexpected changes in the animal's behavior (e.g. no self-grooming or no food/water intake)
- animal response to a stimulus is decreased or changed

We do not expect humane endpoints due to the phenotype of the KO rats.

Indicate the likely incidence.

The animal procedures applied in this study are not expected to lead to a human endpoint.

Combined frequency: <2%

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).

The expected level of discomfort for all animals in this study is mild.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

At different time points the animals are sacrificed by bleeding via heart puncture, followed by cutting the diaphragm, which collapses the lungs, then immediately followed by removal of several tissues. All will be performed under anesthesia, so the animals will not experience discomfort. This is necessary to collect blood and tissues to measure the compound concentrations and to answer our research question.

| 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.

| ☒ Yes

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure Longterm-Behavioral study

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.

Animals used in this study (DJ-1, PINK1 and WT rats) will be bred. The genetically altered animals will have a PD phenotype, so the breeding will be considered with discomfort. In this behavioral study, we evaluate the therapeutic efficacy on different behavioral outcome measures. Behavioral tests chosen, are based on the literature, describing significant differences between the DJ-1, PINK1 KO rats and wildtype (WT) (Dave K.D. 2014). DJ-1 and PINK1 KO rat models display a significant reduction in rearing frequency in the open field compared to wildtype at the age of 6 and 8 months.

Total distance traveled in the open field for PINK1 (not DJ-1) model was significant impaired compared to wild type rats at 4, 6 and 8 months of age. Gait analysis revealed in both rat models at 4 and 8 months of age, a shorter duration in stride, swing and stance. Furthermore, number of both forelimb and hindlimb foot slips in the tapered balance beam test were significantly increased in PINK1, but not in DJ-1 KO rats at 6 and 8 months of age. Based on this phenotypic characterization, robust and specific behavioral dysfunctions are found in both rat models.

2) Behavioral study



Open field (rearing frequency, total distanced traveled)

Gait analysis (duration in stride, swing and stance)

Tampered balance beam test (number of foot slips)

Behavioral analysis

T=1-2m

T=4m

T=6m

T=8m

T=1-2m: Start treatment during asymptomatic phase

T= 2-8m: weekly blood sampling for plasma compound concentrations, oxidative stress markers

T= 8m: end of the study

Long-term treatment will start during the asymptomatic phase at the age of 1-2 months, and preferably administrated via solid food pellets. To control for compound intake, body weight will be monitored daily and blood samples will be taken weekly to measure plasma concentrations and oxidative stress markers. A significant decrease in the body weight of an animal or an insufficient plasma concentration will lead to the exclusion of the animal from the study.

- outcome parameters:

- a) body weight (daily)
- b) plasma compound concentrations (weekly)
- c) oxidative stress markers in the blood (weekly)

The therapeutic effect of the compound will be assessed by different behavioral paradigms, performed at 4, 6 and 8 months of age.

- outcome parameters:

- a) mobility in open field (distance moved in cm)
- b) rearing frequency in open field
- c) gait abnormalities on catwalk (duration in stride, swing and stance)
- d) tapered balance beam performance (number of footslips)

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

The proposed procedures for this study are the following:

- 1) Breeding pairs of DJ-1-/-, PINK1-/- and Long Evans Hooded (LH) rats will be ordered by [REDACTED]. The LH rat is the background strain of the DJ-1 and PINK1 rats and considered as wildtype. For breeding, males and females will be paired, under normal housing conditions in our animal facility.
- 2) Long term treatment with the therapeutic compound starting at the age of 1-2 months until the age of 8 months. Preferably via food pellets.
- 3) If necessary compound administration via osmotic minipumps. Subcutaneous implantation of the osmotic minipump under gas isoflurane anesthesia (max 15 min).
- 4) Body weight will be checked daily (duration 1-2 minutes).
- 5) Blood samples will be taken weekly (duration 5-10 minutes).

6) Open field testing will be performed at the age of 4, 6 and 8 months. At each time point, after habituation to the testing room, animals will be tested for 1 hour sessions. The same protocol will be used as described in the literature (Dave K.D. 2014).

7) Gait analysis will be performed using the catwalk at the age of 4, 6 and 8 months. At each time point, after habituation to the testing room, 5 min sessions will be performed. The same protocol will be used as described in the literature (Dave K.D. 2014).

8) Tampered balance beam test will be performed at the age of 4, 6 and 8 months. At each time point, after habituation to the testing room, testing of 3 consecutive runs will be performed. The same protocol will be used as described in the literature (Dave K.D. 2014).

9) At the age of 8 months the animals will be sacrificed.

All behavioral testing will always be performed in the same order, to prevent any effects of one test on the other. Per day only one test will be performed, with resting days (no test) in between.

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

Before this behavioral study, the dose selection study is performed using selection criteria and go/ no go points.

Primary outcome of this study are the behavioral outcome parameters. [REDACTED] and the literature (Dave et al. 2014) we estimate the group size on 15 animals. Currently, two genetic rat models for Parkinson's Disease (PD) are well defined and available (DJ-1 and PINK1 KO rats). For each study, a control wildtype group will be included.

Total group size 15 X genotypes 3 X treatment groups 2 = 90 animals (30 per animal group)

Breeding information for each animal group:

Mean number of 8 pups per litter

Ratio male/female is 50/50

Breeding success of 80%

DJ-1: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups

To be registered: 14 DJ-1 breeding animals + 40 pups = 54 rats

PINK1: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups

To be registered: 14 PINK1 breeding animals + 40 pups = 54 rats

WT: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups

To be registered: 30 pups used in the experiment.

Grand total: 54 DJ-1 + 54 PINK1 + 30 WT rats = 138 rats

B. The animals

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

Recently, novel rat knockout (KO) models of DJ-1 and PINK1 genes were generated and characterized (1-4). In contrast to mice, the loss of either DJ-1 gene or PINK1 gene in rats result in a marked behavioral dysfunction and significant loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, both major characteristics of Parkinson's Disease (PD). These findings support the use of the DJ-1 and PINK1 KO rat models as relevant animal models for the evaluation of novel therapeutic strategies for PD.

Based on the literature, it is known that the PD symptoms occur in DJ-1 and PINK1 KO rat models between the age of 4 and 8 months. We hypothesize that KH176 will act as a neuroprotective agent by restoring or preventing the cellular redox imbalance, particularly in dopaminergic neurons, and ultimately prevent and/or delay the manifestation of PD. Therefore, we would like to start the treatment in the asymptomatic phase (1-2 months of age).

The background strain of the DJ-1 and PINK1 KO rats is the Long Evans Hooded rat (from [REDACTED]), so this strain is considered as wildtype. Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	own breeding	138	adult and pup

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.

Replacement:

In this project we are evaluating the therapeutic effect of KH176 for the treatment of Parkinson's Disease (PD). Therefore, it is necessary to use relevant animal models that are showing marked clinical PD symptoms (such as loss of dopaminergic neurons, motor impairments). Currently, DJ-1 and PINK1 rat models are the best commercially available animal models for PD.

Reduction:

Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study. We are using the absolute minimum number of animals necessary to still be able to discover potentially statistical significant differences between the various genotypes and/or treatments. Using even less animals leads to an increase of the standard error of mean (sem), thereby reducing the statistical power. Within one batch, all three genotypes (DJ-1, PINK1 and WT) will be included to reduce the number of control animals. By using selection criteria and go/ no go points in our dose selection study, the number of animals used in the behavioral and microdialysis studies will be reduced.

Refinement:

To minimize the animals discomfort in the long term treatment studies, we are aiming on an oral administration via food pellets. Furthermore, the measurements for behavior are non invasive with relative minimal discomfort for the animals.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Animals are group housed. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available. The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

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.

non-applicable

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.

If KH176 will be administrated via osmotic minipumps instead of oral administration via food pellets, animals may experience pain and discomfort due to the subcutaneous implantation of the osmotic minipump under isoflurane anesthesia. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. After surgery, rats will be treated with Flunixin (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available. To prevent stress, animals will be grouped housed during the study. Behavioral testing will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies. No side-effects of the compound are expected. No pharmacological induction of pain/toxicity was observed by KH176 in previous experiments (DEC 2013-210).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress (mild)
- Discomfort due to toxicity of treatment (mild)
- Implantation of osmotic minipump (moderate)
- Blood sampling causing pain and stress (mild)
- Discomfort due to the PD phenotype (mild)

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the handling of the animals and other experimental procedures such as implantation of osmotic minipumps, behavioral testing and blood sampling.

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

Due to stress after surgery, rats may be more afraid to human contact. However, after 3 days of handling, these rats show normal behavior again. No side-effects of the compounds are expected. No pharmacological induction of pain/toxicity was observed by KH176 in previous experiments (DEC 2013-210). By using skilled personnel and previous handling of the animals, the discomfort will be minimized during blood sampling and behavioral testing.

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.

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- 15% weight loss in less than 2 days
- a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment
- unexpected changes in the animal's behavior (e.g. no self-grooming or no water intake), or when the animal response to a stimulus is decreased or changed.
- when the body weight after surgery stays below 85% of the pre-surgery weight for 3 consecutive days

We do not expect humane endpoints due to the phenotype of the KO rats.

Indicate the likely incidence.

The knock-out phenotype is not expected to lead to a human endpoint.
Furthermore, the animal procedures applied in this behavioral study are not expected to lead to a human endpoint.
Combined frequency: <2%

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).

The expected level of discomfort for all animals in this study is moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

This is necessary to collect blood and tissues for further *ex vivo* measurements to answer our research question.

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.

☒ Yes

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 3	Type of animal procedure Longterm treatment-Microdialysis study

2 Description of animal procedures

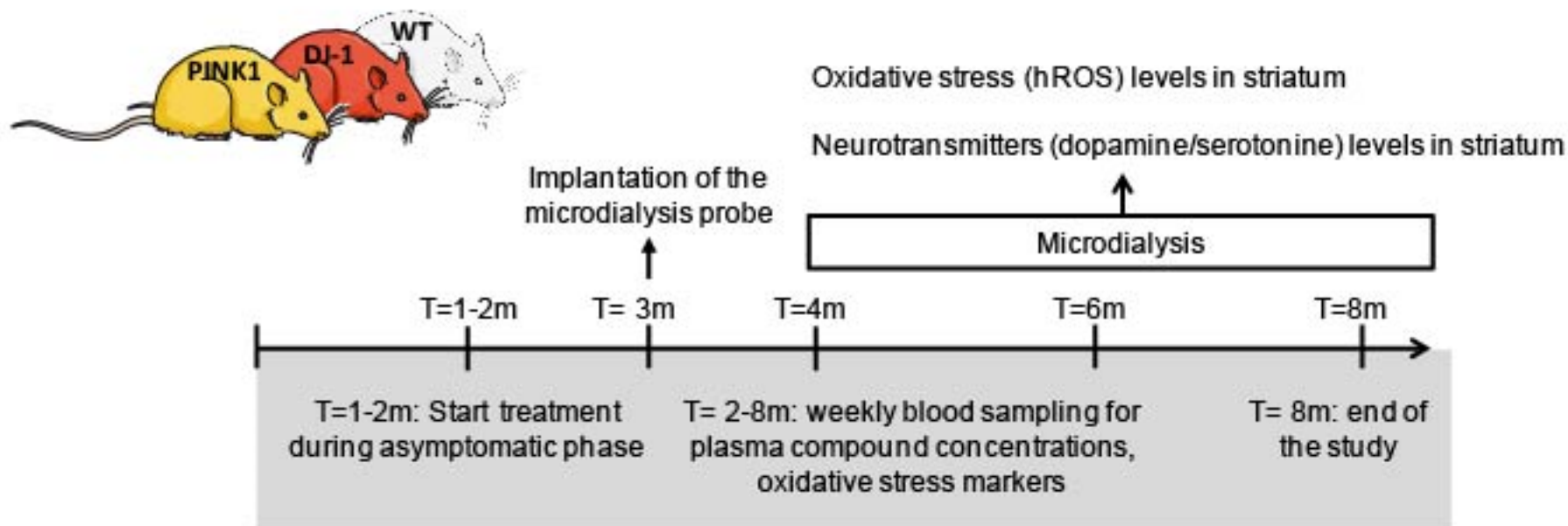
A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Animals used in this study (DJ-1, PINK1 and WT rats) will be bred. The genetically altered animals will have a PD phenotype, so the breeding will be considered with discomfort. In this microdialysis study, we evaluate the therapeutic effect on neurotransmitter levels and oxidative stress (hROS) in the brain.

Based on the literature, we know that there is a significant 2-3 fold increase in striatal dopamine and serotonin level in both DJ-1 and PINK1 KO rats compared to wild type at 8 months of age (Dave K.D. 2014). To date, no information is known on the oxidative stress (hROS) levels in the brain of DJ-1 and PINK1 KO rats.

3) Microdialysis study



Long-term treatment will start during the asymptomatic phase at the age of 1-2 months, and preferably administrated via solid food pellets. To control for compound intake, body weight will be monitored daily and blood samples will be taken weekly to measure plasma concentrations and oxidative stress markers. A significant decrease in the body weight of an animal or an insufficient plasma concentration will lead to the exclusion of the animal from the study.

- outcome parameters:

- a) body weight (daily)
- b) plasma compound concentrations (weekly)
- c) oxidative stress markers in the blood (weekly)

The therapeutic effect of the compound will be assessed by microdialysis, performed at 4, 6 and 8 months of age.

- outcome parameters:

- a) oxidative stress (hROS) levels
- b) neurotransmitter (dopamine and serotonin) levels

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

The proposed procedures for this study are the following:

- 1) Breeding pairs of DJ-1-/-, PINK1-/- and Long Evans Hooded (LH) rats will be ordered by [REDACTED]. The LH rat is the background strain of the DJ-1 and PINK1 rats and considered as wildtype. For breeding, males and females will be paired, under normal housing conditions in our animal facility.
- 2) Long term treatment starting at the age of 1-2 months until the age of 8 months. Preferably via food pellets. If necessary via osmotic minipumps.
- 3) If necessary compound administration via osmotic minipumps. Subcutaneous implantation of the osmotic minipump under gas isoflurane anesthesia (max 15 min).
- 4) Body weight will be checked daily (duration 1-2 minutes).
- 5) Blood samples will be taken weekly (duration 5-10 minutes).
- 6) Stereotactic surgery will be performed at the age of 3 months. Animals will be implanted with a guide cannula in the brain (surgery time approximately 45-60 minutes).
- 7) Microdialysis will be performed at 4, 6 and 8 months of age (duration maximal 8 hours).

8) At the age of 8 months the animals will be sacrificed.

We propose to perform microdialysis because it is a reliable, sensitive, and relatively easy technique to directly measure changes in the extracellular neurotransmitter and oxidative stress levels in the brain. The advantage of the suggested technique above other techniques, like for instance immunohistochemistry, is that one doesn't need to sacrifice a large number of animals to measure the changes over time. In addition, measurements can be performed in freely moving animals. Compared to electronmicroscopy, our technique is faster, more sensitive, cheaper and, most importantly, more quantitative. The suggested procedures are based on previous experience [1]. For the measurement of oxidative stress, the suggested procedure has been recently described and validated by Misini et al. and others [2-4].

[REDACTED]

[REDACTED]

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

Primary outcome of this study are the neurotransmitter levels in the brain. Based on the [REDACTED] group size is estimated on 12 animals. We would like to perform microdialysis in the same animals at three different time points (4, 6 and 8 months of age). Per group 3 rats have been added to compensate for the animals that have to be excluded because of incorrect placement of the microdialysis probe or possible loss of the canula. So total estimated group size is 15 animals.

Currently, two genetic rat models for Parkinson's Disease (PD) are well defined and available (DJ-1 and PINK1 KO rats). For each study, a control wild type group will be included.

Total group size 15 X genotypes 3 X treatment groups 2 = 90 animals (30 per animal group)

Breeding information for each animal group:

Mean number of 8 pups per litter

Ratio male/female is 50/50

Breeding success of 80%

DJ-1: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups
To be registered: 14 DJ-1 breeding animals + 40 pups = 54 rats

PINK1: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups
To be registered: 14 PINK1 breeding animals + 40 pups = 54 rats

WT: 7 breeding pairs, gives 5 expected litters X 8 pups = 40 pups
To be registered: 30 pups used in the experiment.

Grand total: 54 DJ-1 + 54 PINK1 + 30 WT rats = 138 rats

B. The animals

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

Recently, novel rat knockout (KO) models of DJ-1 and PINK1 genes were generated and characterized (5-8). In contrast to mice, the loss of either DJ-1 gene or PINK1 gene in rats result in a marked behavioral dysfunction and significant loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, a major characteristic of Parkinson's Disease (PD). These findings support the use of the DJ-1 and PINK1 KO rat models as relevant animal models for the evaluation of novel therapeutic strategies for PD. These two genetic rat models are commercially available at Sage Labs.

Based on the literature, it is known that the PD symptoms occur between the age of 4 and 8 months. We hypothesize that KH176 will act as a neuroprotective agent by restoring or preventing the cellular redox imbalance, particularly in dopaminergic neurons, and ultimately prevent and/or delay the manifestation of PD. Therefore, we would like to start the treatment in the asymptomatic phase (1-2 months of age).

The background strain of the DJ-1 and PINK1 KO rats is the Long Evans Hooded rat (from Charles River Laboratories), so this strain is considered as wildtype. Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study.

5. Dave KD, De Silva S, Sheth NP, Ramboz S, Beck MJ, Quang C, et al. Phenotypic characterization of recessive gene knockout rat models of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*. 2014;70:190-203.
6. Sun J, Kouranova E, Cui X, Mach RH, Xu J. Regulation of dopamine presynaptic markers and receptors in the striatum of DJ-1 and Pink1 knockout rats. *Neuroscience letters*. 2013;557 Pt B:123-8.
7. Baptista MA, Dave KD, Sheth NP, De Silva SN, Carlson KM, Aziz YN, et al. A strategy for the generation, characterization and distribution of animal models by The Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research. *Disease models & mechanisms*. 2013;6(6):1316-24.
8. Villeneuve LM, Purnell PR, Boska MD, Fox HS. Early Expression of Parkinson's Disease-Related Mitochondrial Abnormalities in PINK1 Knockout Rats. *Molecular neurobiology*. 2014.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat	own breeding	138	adult and pup

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.

Replacement:

In this project we are evaluating the therapeutic effect of KH176 for the treatment of Parkinson's Disease (PD). Therefore, it is necessary to use relevant animal models that are showing marked clinical PD symptoms (such as loss of dopaminergic neurons, motor impairments). Currently, DJ-1 and PINK1 rat models are the best commercially available animal models for PD.

Lower animals cannot be used because there is no microdialysis equipment available (invertebrates) or the surgery procedures are relatively complicated (mice) leading to an unacceptable high exclusion of animals (i.e. mice in which the position of the probe or punch was wrong). Cell-lines cannot be used

because we need link neurochemical changes to changes in behavior. Previous studies shows that in rats microdialysis is relatively easy to perform, resulting in reliable results.

Reduction:

Wildtype, DJ-1 and PINK1 KO rats will be bred in our facility. Since the KO rats will develop a PD phenotype, this breeding is considered with discomfort. To fully optimize the use of all animals born and reduce the number of animals, we will both use males and females in this study. We are using the absolute minimum number of animals necessary to still be able to discover potentially statistical significant differences between the various genotypes and/or treatment. Using even less animals leads to an increase of the standard error of mean (sem), thereby reducing the statistical power. By using selection criteria and go/ no go points in our dose selection study, the number of animals used in the behavioral and microdialysis studies will be reduced. Within one batch, all three genotypes (DJ-1, PINK1 and WT) will be included to reduce the number of control animals.

Refinement:

To minimize the animals discomfort in the long term treatment studies, we are aiming on an oral administration via food pellets.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available. The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, Lidocaine spray will be applied to the periosteum and the skin of the head. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. In order to stay focused, small breaks are taken after the surgery of every two rats and no more than 8 rats will undergo surgery per day. After surgery, rats will be treated with Flunixin (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis.

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.

non-applicable

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.

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, Lidocaine spray will be applied to the periosteum and the skin of the head. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. In order to stay focused, small breaks are taken after the surgery of every two rats and no more than 8 rats will undergo surgery per day. After surgery, rats will be treated with Flunixin (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress (mild)
- Discomfort due to toxicity of treatment (mild)
- Implantation of osmotic minipump (moderate)
- Blood sampling causing pain and stress (mild)
- Discomfort due to the PD phenotype (mild)
- Discomfort due to recovery of surgery (moderate)

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the handling of the animals and other experimental procedures such as surgery, microdialysis and blood sampling.

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

Due to stress after surgery, rats may be more afraid to human contact. However, after 3 days of handling, these rats show normal behavior again.

No side-effects of the compounds are expected. No pharmacological induction of pain/toxicity was observed by KH176 in previous experiments (DEC 2013-210).

By using skilled personnel and previous handling of the animals, the discomfort will be minimized during blood sampling.

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.

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- 15% weight loss in less than 2 days
- a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment
- unexpected changes in the animal's behavior (e.g. no self-grooming or no water intake), or when the animal response to a stimulus is decreased or changed.
- if the animal loses its cannula
- when the body weight after surgery stays below 85% of the pre-surgery weight for 3 consecutive days

We do not expect humane endpoints due to the phenotype of the KO rats.

Indicate the likely incidence.

Previous microdialysis studies have shown that less than 5% of the animals reach their humane endpoint.

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).

The expected level of discomfort for all animals in this study is moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

☐ No

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

This is necessary to collect blood and tissues for further *ex vivo* measurements to answer our research question.

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.

☒ Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0132
2. Titel van het project: Evaluation of potential disease modifying therapeutics for Parkinson's Disease
3. Titel van de NTS: Het evalueren van potentieel nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van Parkinson
4. Type aanvraag:
 - ☐ nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl
6. Adviestraject:
 - ☐ ontvangen door DEC: 24-11-2015
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☐ in vergadering besproken: 01-12-2015 en 05-01-2016
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☐ termijnonderbreking(en) van 08-12-2015 tot 22-12-2015 en van 13-01-2016 tot 14-01-2016
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☐ aanpassing aanvraag: 22-12-2015 en 14-01-2016
 - ☐ advies aan CCD: 09-02-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 08-12-2015
 - Strekking van de vragen:

Niet-technische samenvatting:

-3.5 De gegeven percentages van het totaal aantal dieren zijn bij elkaar opgeteld slechts 95% van de dieren. De commissie betwijfelt of het ongerief voor de dieren in experiment 2 matig is (zie de vragen over DAP2).

-4.3 De keuze voor de diersoort is nog niet verklaard. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.

Project Proposal:

- 3.1 De omschrijving van de te testen compounds (met name de vier die op dit moment nog niet bekend zijn) en de criteria voor het onderzoeken van deze compounds zijn onvoldoende om een ethische afweging te kunnen maken. Wanneer KH176 de gewenste werking heeft, willen de onderzoekers dan nog steeds vier andere compounds testen? Wat is het werkingsmechanisme van KH176 op grond waarvan de onderzoekers positieve resultaten verwachten bij toepassing voor de ziekte van Parkinson? Wat is het verschil in werking met de reeds in clinical trials geteste stoffen? Op welke manier onderscheidt deze stof zich van andere ROS-scavengers?

De vermelding hier en in andere delen van de projectaanvraag dat 'the four other compounds will be defined later on' is de enige informatie welke gegeven wordt om 4/5 van het totaal aantal gevraagde dieren te rechtvaardigen. Indien de onderzoekers niet elk van deze verbindingen benoemen en een duidelijke omschrijving van bijvoorbeeld werkingsmechanisme en toxiciteit kunnen geven is een afweging van het belang van het testen van die verbindingen afgezet tegen het ongerief van de dieren voor de commissie onmogelijk te maken. In dit geval verzoekt de commissie de aanvraag alleen voor KH176 te schrijven.

- 3.1 Verlies van dopaminerge neuronen in de substantia nigra is niet het enige kenmerk van de ziekte van Parkinson. De onderzoekers worden verzocht iets meer aandacht te besteden aan de relevantie van het gekozen KO model voor de humane ziekte.

- 3.1 Wat zijn de verschillen en overeenkomsten tussen de twee genoemde transgene modellen, en komt die overeen met onderverdeling in patiëntengroepen?

- 3.2 De onderzoekers worden verzocht de (binnen vijf jaar) haalbare hoofddoelstelling van het project bondiger te omschrijven. De commissie meent dat het verkrijgen van extra informatie over de rattenmodellen geen doelstelling is, maar een spin-off van het onderzoek.

- 3.4.2 De onderzoekers worden verzocht te verwijzen naar bijlage 3 van de animal procedures in plaats van naar de tab in iVentionLES. De commissie en de CCD beoordelen de aanvraag op basis van alleen de pdf.

- 3.4.2 De onderzoekers willen de farmacokinetiek alleen in wt dieren onderzoeken. De commissie meent dat het verstandig is om te controleren of de farmacokinetiek in de KO dieren exact hetzelfde is.

Description of Animal Procedures:**DAP1**

-1.3 De titel is alleen van toepassing op de farmacokinetiek en niet op het pilotexperiment dat daarna volgt.

- A2: Kunnen de onderzoekers toelichten hoe zij de turn-over van deze stof hebben betrokken bij de keuze voor de vijf tijdstippen?

- A3: De figuur op pagina 4 is onleesbaar.

- I/K: De onderzoekers worden verzocht het ongerief niet als cijfercode maar als woord te vermelden. Het ongerief van een handeling onder een narcose waaruit het dier niet meer bijkomt is terminaal.

- J: De onderzoekers worden verzocht de omschrijving van het tweede humane eindpunt aan te passen. Indien een dier helemaal niet meer op prikkels reageert is het namelijk te laat voor een humaan eindpunt.

-K: zie vraag over onderdeel I.

DAP2

-A2/K: Indien de stof niet via de voeding kan worden gegeven, zullen de dieren gedurende maximaal 7 maanden dagelijkse injecties met de stof krijgen. De commissie meent dat dit vermijdbaar ongerief voor de dieren veroorzaakt, aangezien er alternatieve toedieningsvormen bestaan zoals minipompjes die dagelijkse injecties kunnen vervangen. Het is dan ook onwaarschijnlijk dat de commissie de CCD zal adviseren bijvoorbeeld een dagelijkse i.p. injectie gedurende zeven maanden toe te staan. Dierproeven die met minder ongerief uitgevoerd kunnen worden zijn bij wet niet toegestaan.

-I: Wat is het verwachte ongerief van de behandeling met de compound? Bij I1 wordt dit ingeschaald als matig, terwijl er bij I3 wordt vermeld dat er geen bijwerkingen in de vorm van pijn of toxiciteit worden verwacht van de compound. Ligt een inschaling als licht ongerief als gevolg van de toediening niet meer voor de hand? Dagelijkse injecties gedurende langere tijd geven inderdaad matig ongerief, maar zijn niet toegestaan indien er alternatieven met minder ongerief voor handen zijn.

-I: Wat is het ongerief van de KO muizen? Bij I1 is dit ingeschaald als licht, bij onderdeel J kan het een HEP zijn. De onderzoekers worden verzocht dit duidelijker uit te leggen

DAP3

-I1: het ongerief als gevolg van een operatie is in elk geval matig.

- Datum antwoord: 22-12-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

-3.5: De percentages zijn aangepast. Het ongerief voor experiment 1 en 2 zijn ingeschaald op mild en experiment 3 op matig.

-4.3: De keuze van de diersoort is toegevoegd.

Project Proposal:

-3.1: Het aantal te testen stoffen is gereduceerd naar alleen KH176. Er is meer informatie toegevoegd over het werkingsmechanisme van KH176. Het is belangrijk dat deze informatie patentgevoelig is en dus vertrouwelijk.

-3.1: Wij zijn ons ervan bewust dat het verlies van dopaminerge neuronen niet het enige kenmerk van de ziekte van Parkinson (PD) is. Een uitgebreidere beschrijving van het phenotype van de DJ-1 en PINK1 KO ratten is toegevoegd om de relevantie van deze diermodellen te benadrukken.

-3.1: De verschillen en overeenkomsten tussen de DJ-1 en PINK1 KO ratten en de relatie tot PD patiënten, op basis van de tot nu toe beschikbare data, zijn toegevoegd. Er is nog maar beperkt informatie beschikbaar over de neuropathologie van de twee specifieke patiëntgroepen.

-3.2: Hoofddoelstelling is bondiger opgeschreven.

-3.4.2: De verwijzing is aangepast.

-3.4.2: Het is inderdaad correct dat de farmacokinetiek anders kan zijn in de KO ratten. We zullen de farmacokinetiek nu in alle 3 de diergroepen uitvoeren. Het figuur is hier ook aangepast.

Description of Animal Procedures:**DAP1**

-1.3: De titel is gewijzigd naar “dose selection study”.

-A2: Op basis van eerdere farmacokinetiek studies met KH176 in rat en muis weten we dat 5 tijdstippen genoeg zijn om een betrouwbare curve te maken en de halfwaardetijd van de stof te bepalen. Hiermee beperken we het aantal benodigde dieren

-A3: De figuur is aangepast. Verder zijn de aantallen dieren aangepast.

-I/K: Het ongerief is als woord vermeld.

-J: Het tweede humane eindpunt is aangepast.

DAP2

-A2/K: Alternatieve toedieningsvorm is veranderd naar osmotische minipomp.

-I: Ongerief van de behandeling met KH176 is nu ingeschaald op mild.

-I: Het ongerief van het fenotype van de KO ratten is inderdaad ingeschaald op mild en daarom is deze nu ook weggehaald bij onderdeel J HEP.

DAP3

-I1: het ongerief voor de operatie is nu ingeschaald op matig.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 13-01-2016

- Strekking van de vragen:

Project Proposal:

-3.2 De tekst over de haalbaarheid van de projectaanvraag is weggefallen. De commissie verzoekt de onderzoekers deze weer op te nemen.

Description of Animal Procedures:

-DAP2 en DAP3, onderdeel I: het ongerief van het plaatsen van een mini-pomp is matig i.p.v. licht. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen in deze bijlagen met dierproeven en in de niet-technische samenvatting punt 3.5.

- Datum antwoord: 14-01-2016

- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

-3.2 De tekst over de haalbaarheid is toegevoegd.

Description of Animal Procedures:

-Het ongerief van het plaatsen van de mini-pompjes is veranderd naar matig in DAP2 en DAP3 bij onderdeel I. De classificatie van DAP2 is nu veranderd naar matig ook in de technische samenvatting.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum antwoord: 14-01-2016

- Strekking van de antwoorden:

Project Proposal:

3.2 De tekst over de haalbaarheid is toegevoegd.

Description of Animal Procedures:

- Het ongerief van het plaatsen van de mini-pompjes is veranderd naar matig in DAP2 en DAP3 bij onderdeel I. De classificatie van DAP2 is nu veranderd naar mild ook in de technische samenvatting.

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - ☐ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to evaluate the therapeutic potential of KH176, a new chemical entity, on Parkinson's Disease (PD) phenotype in PD animal models.' De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken of toediening van KH176 leidt tot therapeutische concentraties in de hersenen van ratten, en of KH176 een therapeutisch effect heeft in de gekozen diermodellen voor de ziekte van Parkinson. Deze resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere therapieën voor mensen met de ziekte van Parkinson. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang omdat deze progressieve neurologische ziekte in onze vergrijzende samenleving steeds vaker voorkomt. Op dit moment is genezing niet mogelijk. De symptomen van de ziekte kunnen enigszins bestreden worden met medicatie. De DEC acht dit onderzoek met een potentieel nieuwe medicijn voor de ziekte van Parkinson van substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het effect in KO-ratten van KH176 op gedrag en op neurotransmitter concentraties en oxidatieve stress in de hersenen. Voorts wordt duidelijk of dit middel mogelijk oraal kan worden ingenomen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door het tijdens een operatie implanteren van een canule

in de hersenen of door het subcutaan implanteren van een mini-pompje bij een deel van de dieren. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde wekelijkse bloedafnames, de fok van de KO ratten, het meten van de voedselinname gedurende 7 dagen, de orale gavage, de gedragstesten, en de hartpunctie onder terminale anesthesie in als licht. Het ongerief als gevolg van de operatie waarin een osmotische minipomp onder de huid wordt geplaatst of een canule in bepaalde hersengebieden wordt aangebracht schat de commissie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de ratten in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor 62% van de dieren, en matig voor 38% van de dieren indien KH176 niet via het voedsel kan worden toegediend.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Farmacokinetiek van een stof kan niet in vitro bepaald worden. Een hersenziekte met consequenties voor het gedrag kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolgexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 727 ratten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Er wordt eerst een pilot experiment gedaan om te bepalen of de stof oraal gegeven kan worden door toevoeging aan het voer. Indien dit niet mogelijk blijkt zullen osmotische minipompjes geïmplant worden om te voorkomen dat de dieren gedurende langere tijd dagelijks i.p. of s.c injecties zouden krijgen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de mogelijke toedieningsvorm en therapeutische effecten van KH176 bij ratten die model staan voor de ziekte van Parkinson. Bij positieve resultaten zullen deze kunnen leiden tot het ontwikkelen van nieuwe medicijnen voor mensen met de ziekte van Parkinson. Het belang van meer inzicht in het werkingsmechanisme van KH176 en het beschikbaar komen van nieuwe interventies voor de ziekte van Parkinson acht de DEC substantieel, gezien de toenemende prevalentie van deze ongeneeslijke neuron degeneratieve ziekte in de bevolking.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 62% van de dieren licht ongerief en maximaal 38% van de dieren alle matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de operaties in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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

AVD103002016418

Bijlagen

2

Datum 9 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 9 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016418. 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

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Grooteplein 10
Postbus: 9101, t.a.v. [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: 107850941
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? ☒ [x] 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: 9 maart 2016
Geplande einddatum: 9 maart 2021
Titel project: Evaluation of [REDACTED] as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease
Titel niet-technische samenvatting: Het evalueren van een potentieel nieuw geneesmiddel voor de behandeling van Parkinso
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen (627 DEC B4)
E-mailadres DEC: mensenrechtencommissie@radboudumc.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1441,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Beschrijving Dierproeven
- ☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ Melding Machtiging
- ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Nijmegen

Datum:

9 februari 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002016418

Bijlagen

2

Datum 9 februari 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 9 februari 2016

Vervaldatum: 10 maart 2016

Factuurnummer: 16700418

Ordernummer: 040823-461220 / 2015-0132 / 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002016418	€

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS0569996317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

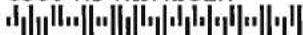


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002016418

Bijlagen

1

Datum 14 maart 2016

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 9 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease" met aanvraagnummer AVD103002016418. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease" starten. De vergunning wordt afgegeven van 14 maart 2016 tot en met 9 maart 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 9 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, aangevuld met de twee algemene voorwaarden zoals hierboven gemotiveerd.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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).

Centrale Commissie Dierproeven

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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 maart 2016 tot en met 9 maart 2021, voor het project "Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease" met aanvraagnummer AVD103002016418, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Instantievoor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 9 februari 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 februari 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 februari 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 februari 2016, ontvangen op 10 februari 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Dose selection study	Ratten (Rattus norvegicus) / WT; DJ-1; PINK1; beide geslachten	451	Licht	Fokken met ongerief.
Longterm-Behavioral study	Ratten (Rattus norvegicus) / Gelijk aan dierproef 1.	138	Matig	Fokken met ongerief.
Longterm treatment-Microdialysis study	Ratten (Rattus norvegicus) / Gelijk aan dierproef 1.	138	Matig	Fokken met ongerief.

Voorwaarden**Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen**

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 14 maart 2016 15:05
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven
Bijlagen: Beslissing projectvergunning dierproeven AVD103002016418.pdf

Geachte heer/mevrouw,

Vriendelijk verwijs ik u naar de brief en de bijlagen.

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 14 maart 2016 15:08
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD103002016418

Geachte RU DEC,

Op 09-02-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Evaluation of KH176 as a potential disease modifying therapeutic for Parkinson's Disease' met aanvraagnummer AVD103002016418.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

De CCD heeft besloten de vergunning te verlenen, onder de volgende algemene voorwaarden:

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de go/no go momenten worden afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, daar 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. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

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