

		Inventaris Wob-verzoek W17-09								
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.		document NTS 20171070	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Aanvraagformulier				x		x	x	
2		NTS	x							
3		Projectvoorstel			x					
4		Bijlage animal procedure			x					
5		Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x	
6		DEC advies				x		x	x	
7		Advies CCD		x						x
8		Beschikking en vergunning				x		x	x	



20 MRT 2017

1.

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in	11400
		☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	64156338
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	de Boelelaan 1117
		Postbus	
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	X Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	X 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 1-6-2017

Einddatum 31-5-2021

- 3.2 Wat is de titel van het project?

New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease.

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

PET tracer ontwikkeling om hersenontstekingsreacties in patiënten met de ziekte van Parkinson te meten

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum

Postadres Amsterdam Nederland

E-mailadres

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?	☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.035 ☐ Wijziging € Lege
4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. <i>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.</i>	☐ Via een eenmalige incasso ☒ Na ontvangst van de factuur* * Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de VU of het VUmc dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling. Inkoopordernummer: 4667599 Factuuradres: VU Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar: Centrale Commissie Dierproeven Postbus 20401 2500 EK Den Haag	Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart: • dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn. • dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid. • dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen. • dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag. • dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld. <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Naam</td> <td style="background-color: black; width: 100px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Functie</td> <td style="background-color: black; width: 250px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Plaats</td> <td>Amsterdam</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Datum</td> <td>16-03-2017</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Handtekening</td> <td style="background-color: black; height: 40px;"></td> </tr> </table>	Naam		Functie		Plaats	Amsterdam	Datum	16-03-2017	Handtekening	
Naam											
Functie											
Plaats	Amsterdam										
Datum	16-03-2017										
Handtekening											



Centrale Commissie Dierproeven

Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl.

1 Gegevens aanvrager

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

Naam van de portefeuillehouder [redacted]
KvK-nummer 64156338
NVWA deelnemernummer 11400

2 Gegevens gemachtigde

- 2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN). Geef aan welk nummer u invult.

☐ KvK-nummer
☒ BSN [redacted]

- 2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?

Naam gemachtigde [redacted]
Adres of postbus [redacted]
Postcode en Plaats [redacted]

☒ Dhr. ☐ Mw.

3 Inhoud machtiging

- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? ☒ Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.
☐ Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken? ☐ Ja > Ga door naar vraag 4
☐ Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u doen?
- ☒ Een projectvergunning aanvragen
 - ☒ Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
 - ☒ Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
 - ☐ Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift.
 - ☐ Alle bovenstaande opties

4 Ondertekening

- 4.1 Onderteken het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Naam gemachtigde

[Redacted]

Datum

1 6 - 0 8 - 2 0 1 6

Handtekening
portefeuillehouder
van de Instelling

[Redacted]

Handtekening
gemachtigde



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 11400
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. VU University Medical Center
- 1.3 Provide the title of the project. New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in 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
- ☐ 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.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a chronic, progressive neurodegenerative disorder affecting mainly elderly people. In the Netherlands, nowadays approximately 70.000 people suffer from this devastating disease,

and with the aging population the incidence will increase even further. The disease is characterized by massive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, but also other brain regions are affected, e.g. striatum, hippocampus, bulbus olfactorius and the brain stem. Neurodegeneration in PD is accompanied by neuroinflammation, characterized by the presence of reactive microglial cells and astrocytes at the sites of neurodegeneration. The neuroinflammatory response is an early phenomenon observed in the affected areas of the PD brain and known to play a cardinal role in disease progression. Nowadays, novel therapeutic strategies are developing to counteract the detrimental neuroinflammatory processes that drive PD pathogenesis. Unfortunately however, (pre)clinical evaluation of these novel therapeutic strategies are hampered by the lack of individual *in vivo* monitoring of target engagement, such as the presence, location and/or active state of microglial cells. Positron emission tomography (PET) is a noninvasive technique able to monitor the *in vivo* fate of specific agents. A PET tracer that would monitor specific reactive microglial cells *in vivo*, in a single individual, would be a huge advantage for target engagement evaluation in both preclinical as well as clinical studies. For animal studies, this would also imply a strong reduction of animals needed for proof-of-concept and/or target-engagement studies that focus on microglial activation.

We discovered that the P2Y₁₂ receptor is a novel target that might specifically detect neuroinflammation *in vivo* using dedicated PET labels. P2Y₁₂ is not expressed on neurons or other cells present in the brain. This combination would imply a potentially highly selective positive PET signal for activated microglia that would be relatively easy to interpret in future (pre)clinical studies. The role of neuroinflammation in PD can only be explored using the appropriate PET tracers, e.g. a very selective PET tracer that preferably only images neuroinflammation. A PET tracer that targets the P2Y₁₂ receptor would be able to answer this. However, such a tracer is not yet available, and thus, there is an urgent need to design, synthesize and evaluate such a ligand, which is the aim of this investigation.

The P2Y₁₂ receptor is overexpressed on activated microglia

The P2Y₁₂ receptor, amongst other proteins, is expressed on activated microglia (Chhor 2013; Gautier 2012; Butovsky 2012). In fact, compared with the expression on other CNS cells, the P2Y₁₂ receptor is over-expressed on mature microglia (Moore 2015, Butovsky 2014; Hickman 2013) and is as such a highly relevant target for the development of microglia-selective PET tracers, since it would provide an imaging tool that is very specific for activated microglia. This is in contrast to currently known PET tracers targeting activated microglia who show expression on macrophages as well.

The P2Y₁₂ receptor is associated with anti-inflammatory (M2 type) activated microglia.

A central characteristic in neuroinflammation is the activation of microglia, a diverse process manifested in distinct activation types, depending on type and phase of pathology (Heneka 2015, Hanisch 2007; Mosher 2014; Saijo 2011). The complex molecular and cellular processes accompanying microglial activation are highly dynamic and may contribute to tissue damage, neurodegeneration and brain dysfunction. However, depending on the activation phenotype, these processes may also promote neuro-regeneration and -restoration (Rivest 2009). Microglial activation is characterized by changes in proliferation, morphology, motility of cellular processes, migration, phagocytic activity and, most importantly, the release of pro- and/or anti-inflammatory cytokines and other signaling molecules (Kettenmann 2011; Mosher 2014). The P2Y₁₂ receptor is correlated to the anti-inflammatory (M2) state of activated microglia and PET tracers targeting the P2Y₁₂ receptor could as such not only image activated microglia, but in addition give valuable information on the phenotype of the activated microglia.

Taken together, there is ample evidence for a distinct role of the P2Y₁₂ receptor in activated microglia, especially in microglia in the anti-inflammatory polarization state. As such the P2Y₁₂ receptor is a highly promising target for imaging purposes. Although the levels of alterations in P2Y₁₂ receptor expression in rodent microglia (Butovsky 2014) are less pronounced than in human microglia (Moore 2015), significant differences in expression levels between microglial phenotypes can still be demonstrated. This is an important aspect with respect to translational research, where a putative target for a PET tracer should be expressed both in rodents and humans.

So far, no PET tracer for the P2Y₁₂ receptor is available. However, we already developed a carbon-11 labeled P2Y₁₂ receptor antagonist, being the first potential PET tracer for the P2Y₁₂ receptor (Janssen 2015, *manuscript in preparation*). Specific binding of was observed in *in vitro* autoradiography studies on mouse brain, in which inflammation was induced *in vivo* via an intracerebroventricular injection of IL-4. Ex vivo biodistribution of compound this initial carbon-11 labeled compound showed that brain uptake

was extremely low, thus limiting its use as a PET tracer for imaging of the P2Y₁₂ receptor in the brain. The low brain uptake could be caused by metabolism of the compound, as preliminary data show metabolism into a more polar radioactive metabolite at 15 minutes post injection, which is most likely a result of ester hydrolysis *in vivo*, yielding the carboxylic acid. This indicates that metabolism could indeed be responsible for low brain uptake. Moreover, the new P2Y₁₂ receptor PET tracer has a relatively high calculated topological polar surface area (tPSA) of 140 Å², which is well above the considered maximum to allow for passive diffusion over membranes (120 Å²) (Bohets 2001, Ertl 2000), such as the blood brain barrier. In addition, a possible role of efflux transporters at the blood brain barrier (e.g. P-gp or BCRP) cannot be excluded, since the high uptake observed in duodenum could be due to these transporters. Despite this negative result, these preliminary data show the potential of P2Y₁₂ receptor PET tracers once they are taken up into the brain. Most importantly, the levels of the tracer in the blood are very low, also at early time points when the tracer is hardly metabolized, so binding of P2Y₁₂ receptor PET tracers to blood platelets expressing the P2Y₁₂ receptor (Hollopeter, 2001) will likely not hamper the application of P2Y₁₂ receptor PET tracers.

To mimic the PD pathogenic processes, we will use the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model. The MPTP model is based on the injection of MPTP, which is a blood-brain barrier-penetrant lipophilic compound that is metabolized into the toxic cation 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) by the enzyme monoamine oxidase B of glial cells. MPP⁺ kills primarily dopamine-producing neurons in for instance the substantia nigra. MPP⁺ interferes with complex I of the electron transport chain, a component of mitochondrial metabolism, which leads to cell death and causes the buildup of free radicals, toxic molecules that contribute further to cell destruction. This model is a widely used and reliable one that not only induces nigrostriatal degeneration, but also pronounced neuroinflammation, alike human PD. Intraperitoneal injection of MPTP, depending on its administration, results in either temporarily dopaminergic depletion or selective and irreversible degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra followed by local microgliosis, pointing out its value as a PD mimicking model. The MPTP model can be administered as an acute model or as a subchronic model, both mimicking different aspects of the disease and mimicking different types of neuroinflammation observed in PD. Thus, although both models induce a neuroinflammatory response, the underlying mechanisms leading to this response and the response itself differ. The acute model is based on several repetitive injections of MPTP in one day, which leads to a reversible temporary depletion of dopaminergic transmission in the dopaminergic neurons of the brain. In contrast, the subchronic model is based on daily injections of MPTP for a period up to 7 days, resulting in irreversible dopamine depletion caused by loss of dopaminergic neurons.

3.2 Purpose

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

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

The overall goal of this project is to evaluate novel PET tracers targeting the P2Y₁₂ receptor as an innovative marker to image neuroinflammation with PET, with a focus on Parkinson's disease (PD).

The two main subobjectives of the project are:

- 1) To determine the optimal time points for maximal P2Y₁₂ expression during and after the MPTP treatment, in both the acute and subchronic model, to evaluate the lead PET tracers and whether the lead tracers are selective for the P2Y₁₂ receptors on activated microglial cells in disease relevant post-mortem brain tissue (target engagement)
- 2) To test whether the lead PET tracers are suitable for imaging microgliosis in both the acute and subchronic MPTP model

The collaboration of excellent scientific expertise from specialized groups of the VUmc/VU combines the ample experience with the MPTP mouse model, both the acute and the subchronic administration model, with extensive experience with preclinical PET tracer design and evaluation in murine models. We have ample experience with both the acute and subchronic MPTP model and have already collected data on the presence and distribution of reactive microglia during both models (Vroon 2007; Andriga 2005). In addition, our partners already developed a PET tracer of the P2Y₁₂ receptor antagonist, demonstrating the feasibility of their approach to develop P2Y₁₂ PET ligands within the time frame of the project.

Therefore, our objectives are certainly achievable within the given timelines. The current project is peer-reviewed and financed by a singular international non-profit organization supporting PD research.

3.3 Relevance

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

Social benefit: The project is highly social beneficial as novel therapeutic strategies, developed to counteract the detrimental neuroinflammatory processes that drive PD pathogenesis, are hampered by the lack of individual *in vivo* monitoring of target engagement, such as the presence, location and/or active state of microglial cells. PET is a noninvasive technique that enables monitoring the *in vivo* fate of a specific agent. A PET tracer that would monitor specific reactive microglial cells *in vivo*, in a single individual, would be a huge advantage for target engagement evaluation in both preclinical as well as clinical studies. For individual patients, neuroinflammation could be monitored leading to 'personalized therapy' to optimize the therapeutic strategy at hand. In addition, neuroinflammation plays an important role in many neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease and Multiple Sclerosis. Having a PET tracers that could monitor neuroinflammatory processes in these diseases will lead to similar benefits as for PD patients. In addition, for animal studies, this would also imply a strong reduction of animals needed for proof-of-concept and/or target-engagement studies.

Scientific benefit: *In vivo* PET tracers for neuroinflammation will provide insight into the pathogenesis of neuroinflammation during the course of disease. This will not only be restricted to PD, but is also of value for all neurological disorders in which neuroinflammation plays an important role.

3.4 Research strategy

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

In order to increase the chance of the development of successful radiotracers for the P2Y₁₂ receptor as an *in vivo* biomarker of the neuroinflammatory state in PD brain, proper *in vitro* validation of the target is required. For this purpose we plan to use freshly frozen and/or fixed tissue sections of post-mortem brain tissue from well-characterized and matched PD patients and control cases. Immunohistochemistry (IHC) using a commercially available antibody, which has shown its use on post-mortem material from a stroke patient, will be performed on freshly frozen as well as on formalin fixed and paraffin embedded brain tissue sections to study the presence and distribution of the P2Y₁₂ receptor, in particular in the substantia nigra, olfactory bulb and hippocampus. These stainings will be combined with double stainings for microglia markers, including CD68 and Iba-1, and an astroglial marker, i.e. GFAP, for identification of the glial cell-type expressing the P2Y₁₂ receptor. We have ample experience with these techniques in PD brain material. If successful, these experiments will be followed by qPCR on tissue extracts and autoradiography on snap-frozen tissue sections using radiolabeled P2Y₁₂ receptor ligands, to investigate the expression levels of the P2Y₁₂ receptor gene and to characterize the role of the receptor in neuroinflammation in PD, respectively. In addition, using immunohistochemistry (IHC) and autoradiography (*in vitro* evaluation of a radioactive substance) on post-mortem murine tissue, we will first analyze the expression level of the P2Y₁₂ receptor on microglia during and after the MPTP treatment in a time-dependent manner. Using the optimal time points during and/or after the MPTP treatment regime, during which the P2Y₁₂ receptor is abundantly expressed on microglial cells, target validation of the tracers using autoradiography will be performed (Figure 1). In addition, by making use of these time points in which optimal microglial P2Y₁₂ receptor expression is achieved during and/or after MPTP treatment, we will evaluate the ability of the tracers to image reactive microglia *in vivo* using both a combination of PET with x-ray computed tomography (CT) and a combination of PET with magnetic resonance (MR) imaging in both the acute and subchronic MPTP mouse model. Combining PET with CT will result in not only functional images that depict the spatial distribution of a tracer in the body (obtained by PET), but these images can now be more precisely aligned or correlated with anatomic imaging obtained by CT scanning. By combining PET with MR imaging, the PET signal can be aligned with the soft tissue morphological images for high spatial resolution. The high spatial resolution is also of importance in other diseases, as the brain location of neuroinflammation is often typical for the neurodegenerative disease at hand. In the similar animals used for PET imaging, *in vitro* autoradiography, IHC and qPCR on brain tissues of these animals will be performed after they are sacrificed in order to assess P2Y₁₂ receptor expression, thus validating the signal that was measured with PET (Figure 1).

Given the observation that compound Carbon 11-tracer showed very limited brain uptake, new lead compounds need to be identified with a focus on high affinity for the P2Y₁₂ receptor in combination with

a high chance of brain uptake. Since P2Y₁₂ receptor antagonists have not been investigated for their activity in the brain, no experimental data are available from literature.

Therefore new compounds need to be identified that meet the following criteria:

- High affinity for the P2Y₁₂ receptor, K_D or $K_i < 10$ nM
- cLogP between 2 and 4
- tPSA below 90 Å²

We prefer compounds with a high affinity for the receptor and an upper limit of 10 nM is generally suited for neuroreceptor PET tracers, given the fact the binding potential (BP, B_{max}/K_D) of the ideal neuroreceptor PET tracer should preferably be higher than 10 (Mintun 1984). Since the B_{max} is yet unknown, the K_D should be low. The limits for cLogP are not absolute since there are successful neuroreceptor PET tracers known that exceed the cLogP limit of 4 (Pike 2009), while the limit for tPSA is generally accepted as suitable for drugs that need to pass the blood brain barrier (Hitchcock 2006, Kelder 1999). One of the compounds meeting the requirements is tracer **2**, which has been published in a US patent (Lee 2011). Compound **2** has a K_i of 0.3 nM in a human platelet aggregation assay, its calculated LogP is 3.1 and the tPSA is 65 Å² making **2** an ideal new compound for PET tracer development.

In case P2Y₁₂ receptor expression in both human post-mortem as well as in the MPTP mouse models is below background, or not correlated with microglial activation and/or pathology, no further experiments will be performed. In addition, when the novel PET tracers do not meet the above described criteria, also no further animal experiments will be performed with these tracers.

Details concerning the animal model.

We will use two different MPTP treatment regimens to achieve both the acute and the subchronic MPTP model. In addition, we will use both models for 1) obtaining MPTP treated post-mortem brain tissue to evaluate P2Y₁₂ receptor expression in microglial cells in affected regions in time, and 2) *in vivo* PET tracer evaluation. The acute MPTP model consists of a maximum of 4 i.p. injections of 30 mg/kg MPTP during one day. The control group will be injected with physiological salt solution. Animals will be sacrificed using cervical dislocation (experiment 1) or an overdose of anesthetics (experiment 2).

The subchronic MPTP model consists of a once daily injection i.p. of MPTP 30 mg/kg for a maximum of 7 days. The control group will be injected with physiological salt solution. Animals will be sacrificed using cervical dislocation (experiment 1) or an overdose of anesthetics (experiment 2). To determine the expression level of the P2Y₁₂ receptor on reactive microglia during and after both the acute and the subchronic MPTP treatment regime, animals will be sacrificed at specific time points during and after the treatment with MPTP. For the acute MPTP model, animals will be sacrificed after the second injection, shortly after the last injection, and 12, 24 and 48 hours after the injection.

For the subchronic MPTP model, animals will be sacrificed every 24 hours after the first injection up to 2 days after the final injection.

For *in vivo* PET tracer evaluation (both PET/CT and PET/MR combination), animals will be anesthetized and PET tracer will be injected into the tail vein. Under complete anesthesia, animals will remain in the PET/CT or PET/MR imaging scanner for a maximum of 80 minutes, as we will make use of either fluorine-18 or carbon-11 labelled tracers. For the acute model, each animal will be analyzed by PET scanning with a maximum of 2 times. For the subchronic model, each animal will be scanned for a maximum of 6 times. During each scan (duration of PET/CT is approximately 60 min, and for PET/MR imaging 80 min), in which the animal is anesthetized, a maximum of 3 times a small size blood sample will be collected for determination of tracer concentration and metabolite formation.

To determine PET tracer specificity, a displacement study needs to be performed. Several minutes after the radiolabeled tracer is injected, a non-labeled P2Y₁₂ antagonist is injected to compete with and displace the tracer. To determine the optimal time between radiolabeled PET tracer and the non-labeled compound, the PET tracer imaging signal (obtained using PET imaging) within the brain needs to be determined.

The treatment regimens for both the acute and subchronic model are well defined in literature. In addition, we have experience working with this model previously.

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.

Animal experiments will consist of

- 1) using both the acute and subchronic MPTP toxicity model for *in vitro* time-dependent evaluation of the P2Y₁₂ receptor expression and validation of tracer binding to the target
- 2) using both the acute and subchronic MPTP toxicity model for PET imaging to evaluate the radiolabeled compounds as a PET tracer followed by *in vitro* post-mortem validation of the PET signal

Together, our proposed experiments will consist of treatment of mice with MPTP in an acute and a subchronic administration model or no treatment.

For 1) the animals will be treated with MPTP, either acute or subchronic administration, or no treatment and post-mortem tissue will be used to determine the maximal expression levels of the P2Y₁₂ receptor during and after MPTP exposure and for target validation (Figure 1)

For 2) the animals will be treated with MPTP, either acute or subchronic administration, or no treatment and injected under anesthesia with the PET tracer for either PET/CT or PET/MR imaging. After the final PET/CT or PET/MR scan, animals will be sacrificed and post-mortem tissue will be used for target validation of the PET signal (Figure 1).

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.

Using IHC, we will first analyze the presence and expression levels of the P2Y₁₂ receptor over time on activated microglia in post-mortem brain of MPTP treated mice, both the acute and subchronic model. The time points in which the P2Y₁₂ receptor is maximally expressed on this post-mortem tissue will be used to determine target validation of the PET tracer using autoradiography. This approach reduces the numbers of animals needed for PET imaging (which leads to a higher level of discomfort), and assures the optimal conditions to test the PET tracer potential. Tracers that show no selectivity or binding towards the P2Y₁₂ receptor in autoradiography experiments will not be used for PET imaging. In addition, we will evaluate our tracer's abilities to image reactive microglia *in vivo* using PET/CT and PET/MR imaging in both the acute and subchronic MPTP mouse model, using the time points for optimal P2Y₁₂ expression found in experiment 1. Using the brain of these same animals, *in vitro* autoradiography, IHC and qPCR will be performed to assess P2Y₁₂ receptor expression, thus validating the signal that was measured with PET.

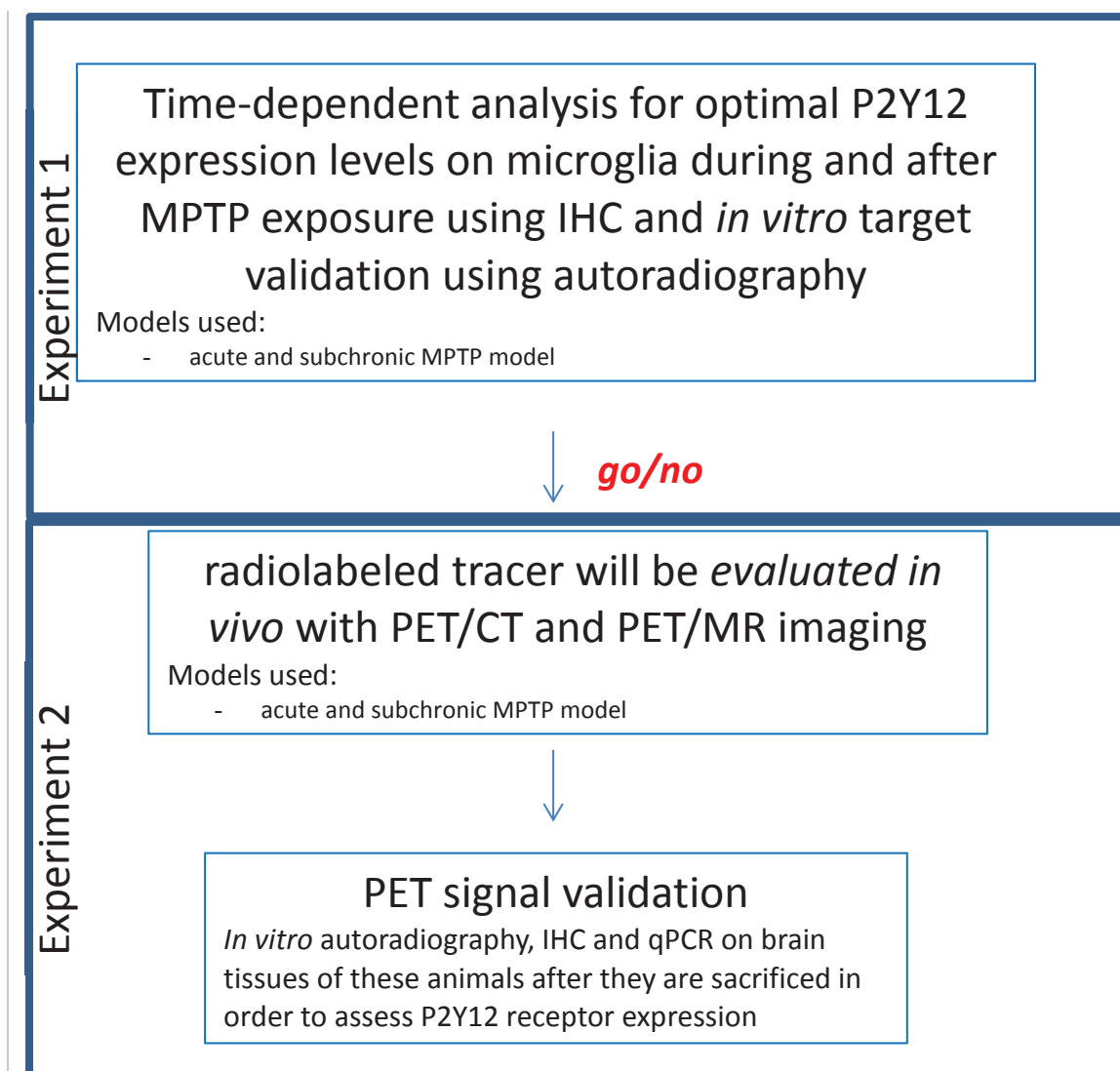


Figure 1: The project strategy consist of in vitro validation of target engagement by the novel PET tracers in post-mortem brain tissue of the MPTP models. Optimal P2Y12 expression on microglia, using immunohistochemistry (IHC) during and after MPTP exposure will be determined for target validation of the PET tracers. In case the PET tracer demonstrates *in vitro* target engagement, *in vivo* evaluation of the tracer will be performed using both PET/CT and PET/MR imaging, followed by *in vitro* post-mortem PET signal validation.

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	PET tracer evaluation in both the acute and subchronic MPTP mouse model
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	VU University Medical Center	
1.3	List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number #1	Type of animal procedure PET tracer evaluation in both the acute and subchronic MPTP mouse model

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.

To evaluate novel PET tracers for microglia activation in PD brain, the aim of the following animal experiment is to mimic PD-related dopamine depletion, neurodegeneration and neuroinflammation in a mouse model. We will use the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model as it is ideal to study effects of therapeutic intervention strategies, because MPTP is an easy administrable neurotoxin that offers the flexibility of creating both an acute or subchronic model that mimics dopaminergic depletion or neurodegeneration, respectively. The acute MPTP model is a fast and reversible model mimicking dopamine depletion without actual neurodegeneration. In the subchronic model, the toxin leads to neurochemical and histopathological alterations that replicate very closely the pattern of dopaminergic degeneration observed in PD (Prezedborski and Vila, 2003). Although both models result in neuroinflammation (Vroon 2007), the underlying pathogenesis that drives this neuroinflammation differs. So far, it remains unclear which type of neuroinflammation (e.g. receptor expression and microglial activation state) is of importance for the pathogenesis of PD and the development of neurodegeneration in PD. Therefore, it is of crucial importance to evaluate both the acute and the subchronic type of induction of neuroinflammation in a PD mimicking animal model. Here, we will use both the acute and subchronic model in order to determine both the distribution of P2Y₁₂-positive microglia in control and MPTP-induced PD pathology, and to validate our newly synthesized P2Y₁₂ PET ligands for specificity *in vitro* and *in vivo*.

Primary outcome measurements:

- 1) immunohistochemical (IHC) evaluation of the time-dependent P2Y₁₂ receptor expression on microglial cells in the post-mortem brains of untreated and both acute and subchronic MPTP

- 2) target engagement of the PET tracers in microglial cells in both the acute and subchronic MPTP mouse model using autoradiography (experiment 1)
- 3) evaluate the ability of the PET tracers to image reactive microglia *in vivo* using PET/CT and PET/MR imaging in controls and both the acute and subchronic MPTP mouse model. Using the brain of these same animals, *in vitro* autoradiography, IHC and qPCR will be performed to assess P2Y₁₂ receptor expression, thus validating the signal that was measured with PET. (experiment 2)

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

We will use two different MPTP treatment regimens to achieve both the acute and the subchronic MPTP model. In addition, we will use both models for 1) obtaining MPTP treated post-mortem brain tissue to evaluate P2Y₁₂ receptor expression in microglial cells in affected regions in time, and 2) *in vivo* PET tracer evaluation.

The acute MPTP model consists of a maximum of 4 i.p. injections of 30 mg/kg MPTP during one day. The control group will be injected with physiological salt solution. Animals will be sacrificed using cervical dislocation (experiment 1) or an overdose of anesthetics (experiment 2).

The subchronic MPTP model consist of a once daily injection i.p. of MPTP 30 mg/kg for a maximum of 7 days. The control group will be injected with physiological salt solution. Animals will be sacrificed using cervical dislocation (experiment 1) or an overdose of anesthetics (experiment 2).

To determine the expression level of the P2Y₁₂ receptor on reactive microglia during and after both the acute and the subchronic MPTP treatment regime, animals will be sacrificed at specific time points during and after the treatment with MPTP.

For the acute MPTP model, animals will be sacrificed after the second injection, shortly after the last injection, and 12, 24 and 48 hours after the injection.

For the subchronic MPTP model, animals will be sacrificed every 24 hours after the first injection up to 2 days after the final injection.

For *in vivo* PET tracer evaluation (both PET/CT and PET/MR combination), animals will be anesthetized and PET tracer will be injected into the tail vein. Under complete anesthesia, animals will remain in the PET/CT or PET/MR imaging scanner for a maximum of 80 minutes, as we will make use of either fluorine-18 or carbon-11 labelled tracers. For the acute model, each animal will be analyzed by PET scanning with a maximum of 2 times. For the subchronic model, each animal will be scanned for a maximum of 6 times.

During each scan (duration of PET/CT is approximately 60 min, and for PET/MR imaging 80 min), in which the animal is anesthetized, a maximum of 3 times a small size blood sample will be collected for determination of tracer concentration and metabolite formation.

To determine PET tracer specificity, a displacement study needs to be performed. Several minutes after the radiolabeled tracer is injected, a non-labeled P2Y₁₂ antagonist is injected to compete with and displace the tracer. To determine the optimal time between radiolabeled PET tracer and the non-labeled compound, the PET tracer imaging signal (obtained using PET imaging) within the brain needs to be determined.

The treatment regimens for both the acute and subchronic model are well defined in literature. In addition, we have experience working with this model previously.

Timelines: mice in test

Experiment 1

For the acute model:

- 7 mice will be in the test for 24 h
- 7 mice will be in the test for 25-26 h
- 7 mice will be in the test for 36 h
- 7 mice will be in the test for 48 h
- 7 mice will be in the test for 72 h

For the chronic model:

- 7 mice will be in the test for 24 h
- 7 mice will be in the test for 2 days
- 7 mice will be in the test for 3 days
- 7 mice will be in the test for 4 days
- 7 mice will be in the test for 5 days
- 7 mice will be in the test for 6 days
- 7 mice will be in the test for 7 days
- 7 mice will be in the test for 8 days
- 7 mice will be in the test for 9 days

Experiment 2

Control mice will be in the test for a maximum of 80 minutes (imaging time)

For the acute model, 128 mice will be in the test between 24h and 72h, depending on the maximal microglial activity to be found in time in the model. Plus a maximum of 80 minutes imaging time.

For the chronic model, 128 mice will be in the test between 24h and 9 days, depending on the maximal microglial activity to be found in time in the model. Plus a maximum of 80 minutes imaging time.

For the displacement studies,

32 control mice will be in the test for a maximum of 80 minutes (imaging time)

32 acute model subjected mice will be in the test for a time between 24 – 72h (depending on the maximal microglial activity to be found in time in the model). Plus a maximum of 80 minutes imaging time.

32 chronic model subjected mice will be in the test for a time between 24h and 9 days (depending on the maximal microglial activity to be found in time in the model). Plus a maximum of 80 minutes imaging time.

Pharmacokinetic brain profiling: 16 mice for a maximum of 80 minutes (imaging time)

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

Given our experience with both the acute and subchronic model and its known reproducibility, we request a minimal number of animals for each experiment (see B). We will scan one animal multiple times to reduce the total of animals needed for completion of the study. In addition, we will determine pharmacokinetic profiles of the injected tracers by evaluating the tracer amounts during the scans within a single animal via multiple blood sampling. Furthermore, we included go/on-go criteria for each tracer (experiment 1), that will result in a reduction in animal numbers. In case of a successful fluorine-18 labelled tracer, we will not evaluate the carbon-11 labelled analogue of the same tracer. Animals requested in B are based on our extensive experience with both the MPTP model, as well as experience in tracer evaluation, both *in vitro* and *in vivo*.

B. The animals

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

Species: Mice

Origin: C57BL/6 mice will be obtained from a commercial licensed breeder.

Gender: male. From the literature, it is known that in female mice MPTP toxicity is more severe when compared to male mice. For statistical reasons (i.e. number of animals required for sufficient statistical power), this difference between the level of toxicity of MPTP between male and female mice hampers the use of both sexes within one experiment. In addition, our experience of dose and the time of injection of MPTP, with both the acute and the subchronic model are based upon the use of males only.

Life stage: mice used for the study will be within the range of 8-10 weeks, with a weight range of 25-30 gram.

Study arms: Two experiments (experiment 1 and 2), both divided into a control, an acute and a subchronic dosing regimen.

Estimated numbers of animals:

Experiment 1

Given our experience with both the acute and subchronic model and its known reproducibility a total number of 7 animals of each model for each time point will be sufficient to obtain the required post-mortem brain tissue to determine the maximal P2Y₁₂ receptor expression on microglial cells and target engagement of the PET tracers. In addition, **7 non-treated mice** are requested as a control.

We request for the acute model 5 time points*7 animals = **35 mice**.

For the subchronic model 9 time point*7 animals = **63 mice**.

Total, 105 mice

Experiment 2

For *in vivo* PET tracer analysis, we will analyse a maximum of 4 different tracers, either labeled with fluorine-18 or carbon-11. Each tracer will be evaluated by both PET/CT as well as PET/MR imaging, in both the acute and subchronic model.

Based on our experience with the MPTP model and PET tracer evaluation, we request

Controls: n = 4 for both PET/CT and PET/MR imaging; 4 animals * 4 tracers * 2 imaging techniques = total **32 mice**

MPTP acute model: n = 8 for 4 tracers (n = 32), both fluorine-18 and carbon-11 labeled (n = 64), both PET/CT and PET/MR imaging (n = 128); total of **128 mice**

MPTP subchronic model: n = 8 for 4 tracers (n = 32), both fluorine-18 and carbon-11 labeled (n = 64), both PET/CT and PET/MR imaging (n = 128); total of **128 mice**

To determine PET tracer specificity, a displacement study needs to be performed. Several minutes after the radiolabeled tracer is injected, a non-labeled P2Y₁₂ antagonist is injected to compete with and displace the tracer. Based on our experience, for each tracer a maximal numbers of animals 4 is required. We will use 4 tracers (labelled with either fluorine-18 or carbon-11 labeled = 8). Together this requires 4*8 = 32 mice. In addition, we will perform such a displacement study in all experimental groups (control, MPTP acute and MPTP chronic). Total of 32 mice * 3 experimental groups = **96 mice**. To determine the optimal time between radiolabeled PET tracer and the P2Y₁₂ antagonist, a pharmacokinetic profile of each tracer within the brain needs to be determined. For this, a maximum of 2 animals per tracer is requested. 2 animals * 4 tracers * 2 radiolabels (fluorine-18 or carbon-11). **N= 16 mice**.

Total experiment 2, 400 mice.

In total, a number of maximal 505 mice is requested.

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: Evaluation of PET tracers is only possible in animals, as the pharmacokinetic and PET tracer distribution is of crucial importance to determine the efficacy and specificity of the tracer for human use. We will use mice as we have ample experience with the MPTP model, both the acute and subchronic administration model, in these animals. In addition, in other laboratories, mice are the most frequently used animals for the MPTP models.

Reduction: As we have extensive experience with the use of both the MPTP model in mice as well as with PET tracer evaluation, this results in the use of smaller numbers of animals and reduced variation with groups. Reduction in animals needed for PET tracer evaluation is achieved by determining the optimal P2Y₁₂ expression levels on microglia prior to the PET analysis. This narrows the time window for PET imaging and thus reduces animal numbers for PET tracer evaluation. In case of a successful fluorine-18 labelled tracer, we will not evaluate the carbon-11 labelled analogue of the same tracer. In addition, a reduction of animals needed in experiment 2 will be achieved as each animal will be scanned multiple times, to obtain a time-dependent PET tracer signal that reflects the course of neuroinflammation during the MPTP treatment.

Refinement:

We will reduce stress for the animals by allowing them to have enough time to habituate (at least 7 days) and provide materials to enrich the home cage environment (e.g. nesting material, tube, piece of wood). In addition, our personnel has many years of experience with animal experimentation, which benefits the swiftness and accuracy of the biotechnical actions, such as PET scanning, cervical dislocation, injection of anesthetics, MPTP and PET tracers, and blood sampling. To reduce pain, adequate anesthetics will be used. In addition, as sign of pain are reported, appropriate pain relieving measures will be taken.

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

Previous experience of our group with both the acute and the subchronic model demonstrated that in both models animals do not demonstrate signs of pain or other types of discomfort. In general, suffering through stress and fear is reduced by good housing conditions (habituation, cage enrichment) and by taking care that experiments are performed under optimal conditions (handling of animals, skilled personnel).

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.

Until now, no PET tracer development based on the P2Y₁₂ receptor to determine *in vivo* microglial activation for monitoring neuroinflammation in PD has been described in literature.

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

☒ 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.

When animals show sign of pain, appropriate analgesia will be applied.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In theory, the subchronic administration model of MPTP (using doses of >50mg/kg/day) could result in systemic toxicity resulting in heart failure and overall discomfort. This is reflected in weight loss. However, our proposed dosing regimen, based on our previous experience with the model, is not likely to result in these side-effects.

Explain why these effects may emerge.

These effects are a direct consequence of the procedures in this appendix.

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

Close monitoring of the animals during MPTP treatment (weight loss, behaviour)

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.

Animal weight will be monitored regularly. In general: weight loss (decrease of >20%) from the highest recorded body weight of the animal), abnormal/unexpected behaviour and/or posture, general signs of illness and/or discomfort. The discomfort will never be allowed to increase to more than moderate; animals will be killed if it is expected that discomfort will progress beyond moderate.

Indicate the likely incidence.

Maximal 5%.

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').

	Model	Type of discomfort	Level of discomfort	Duration of discomfort
Experiment 1: obtaining MPTP post-mortem tissue	Control animals (7)	• injected with salt solution • Cervical dislocation	• Mild	• Seconds
	Acute (35)	• MPTP injection (i.p.) • MPTP-induced symptoms • Cervical dislocation	• Moderate (max.) • Moderate • Mild	• Minutes • Max. 48 h • Seconds
	Subchronic (63)	• MPTP injection • MPTP-induced symptoms • Cervical dislocation	• Moderate (max.) • Moderate • Mild	• Minutes • Max. 8 days • Seconds
Experiment 2: In vivo PET tracer evaluation	Control animals, PK and displacement study (32 + 96 + 16)	• I.V. injection of PET tracers, anesthesia, PET scan (max. 6 scans/mouse), blood sampling • Terminal anesthesia	• Moderate (cumulative discomfort) • Mild	• Max. 80 min/scan • Minutes
	Acute (128)	• MPTP injection • MPTP-induced symptoms • I.V. injection of PET tracers, anesthesia, PET scans (max. 4 scans/mouse), blood sampling • Terminal anesthesia	• Moderate (max.) • Moderate • Moderate (cumulative discomfort) • Mild	• Minutes • Max. 48 h • Max. 80 min • Minutes
	Subchronic (128)	• MPTP injection • MPTP-induced symptoms • I.V. injection of PET tracers, anesthesia, PET scans (max. 6 scans/mouse), blood sampling • Terminal anesthesia	• Moderate • Moderate • Moderate (cumulative discomfort) • Mild	• Minutes • Max. 8 days • Max. 80 min /scan • Minutes
The expected percentage of animals that will experience the indicated level of mild discomfort is 1,4% and moderate discomfort is 98,6%.				

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.

In experiment 1, analysis of both anti-P2Y12 antibodies and PET tracer target engagement in both the acute and subchronic model requires post-mortem brain tissue of the treated and control mice is a primary outcome measurement. In experiment 2, verification of the <i>in vivo</i> PET tracer signal using autoradiography of the post-mortem brain tissue is of importance to evaluate the target engagement and specificity of the PET tracer.
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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

AMSTERDAM

**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
AVD1140020171070

Bijlagen

2

Datum 21 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 maart 2017. Het gaat om uw project "New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1140020171070. 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).

Datum:

21 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020171070

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
21 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020171070

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 64156338
Straat en huisnummer: de Boelelaan 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
21 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020171070

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Adres: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED] AMSTERDAM

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

- ☒ Een projectvergunning aanvragen
- ☒ Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- ☒ Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- ☐ Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- ☐ Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- ☒ Nieuwe aanvraag
- ☐ Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- ☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum:

1 juni 2017

Geplande einddatum:

31 mei 2021

Titel project:

New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease.

Titel niet-technische samenvatting:

PET tracer ontwikkeling om hersenontstekingsreacties in patiënten met de ziekte van Parkinson te meten.

Naam DEC:

DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum

Postadres DEC:

[redacted]
Amsterdam/ Nederland

E-mailadres DEC:

[redacted]

Datum:

21 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020171070

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1035,-

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:

[redacted]

Functie:

[redacted]

Plaats:

Amsterdam

Datum:

16 maart 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

AMSTERDAM

**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
AVD1140020171070

Bijlagen

2

Datum 21 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 21 maart 2017
Vervaldatum: 20 april 2017
Factuurnummer: 171070
Ordernummer: Inkoopordernummer: 4667599

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1140020171070	€ 1035,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
11400
2. Titel van het project:
New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease.
3. Titel van de NTS:
PET tracer ontwikkeling om hersenontstekingsreacties in patiënten met de ziekte van Parkinson te meten
4. Type aanvraag:
nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC: *26-01-2017*
 - ☐ aanvraag compleet: *26-01-2017*
 - ☐ in vergadering besproken: *14-02-2017*
 - ☐ anderszins behandeld: *n.v.t.*
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - ☐ aanpassing aanvraag: *17-02-2017*
 - ☐ advies aan CCD: *16-03-2017*
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
 -Datum advies IvD: *26-01-2017*
 -Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1

- Datum: *15-02-2017*
- Strekking gestelde vragen: *Graag ziet de DEC meer uitleg bij de achtergrond, de haalbaarheid en bij experiment 1. Onderdeel 3.4.1 is nog niet helder. Welke informatie ga je verzamelen en hoe leidt dit tot het beantwoorden van het doel? Graag weergeven: het model, de interventies en de uitleesparameters. Graag nog wat extra uitleg bij de mate van ongerief.*
- Datum antwoord: *17-02-2017*

- Strekking van de antwoord(en): *De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) : *n.v.t.*

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom: n.v.t*

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/ no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. *Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming): n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie translationeel onderzoek is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. *Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.*

De ziekte van Parkinson is een hersenziekte waarbij specifieke zenuwcellen in de hersenen verloren gaan. Hierdoor hebben patiënten met deze ziekte last van trillende handen en benen, verminderde beweging, stijfheid van de spieren en geheugenproblemen. Het is bekend dat bij Parkinson de activering van de afweercellen van de hersenen, de zogenaamde microgliacellen, een ongunstig effect hebben op het verloop van de ziekte. Daarom worden er nieuwe therapieën ontwikkeld, die als doel hebben de activatie van deze microgliacellen te verminderen. Echter is er nog geen goede manier om in de patiënt zelf aan te tonen of de nieuwe behandelmethode

daadwerkelijk de activatie van microgliacellen tegen gaat. Met behulp van positronemissietomografie (PET), een beeldvormende techniek waarbij een stof wordt gemerkt met een radioactief isotoop (een zogenaamde PET tracer) zou dit wel kunnen.

Het directe doel van deze studie is het testen van nieuwe specifieke radioactieve PET tracers voor het imagen van actieve microgliacellen bij een diermodel voor de ziekte van Parkinson. Het uiteindelijke doel is om met behulp van PET tracers, de activiteit van microgliacellen in de hersenen van Parkinson patiënten te meten. Zodat de effectiviteit van nieuwe behandelmethode, gericht tegen het voorkomen van activatie van microgliacellen, beter en sneller kan worden bestudeerd. Dit zal bijdragen aan het onderzoek naar nieuwe efficiëntere behandelmethode voor Parkinsonpatiënten. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst te bereiken.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden

De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten. De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Het onderzoek zal bijdragen aan het beter en sneller bestuderen van de effectiviteit van nieuwe behandelmethode bij Parkinsonpatiënten.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: n.v.t

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen bijdragen aan effectievere behandelmethode voor patiënten met de ziekte van Parkinson. De gevraagde looptijd van 4 jaar acht de DEC reëel gezien de opzet van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.

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

De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

Het cumulatieve ongerief is matig voor 98.6% van de dieren. De controle dieren in experiment 1 (1,4%) zullen alleen een injectie met zoutoplossing krijgen, waardoor ze maximaal licht ongerief ervaren. De rest van de dieren zal licht tot maximaal matig ongerief ervaren, als gevolg van injecties, meerdere malen anesthesie in combinatie met PET scans, bloedafname en door het ontstaan van ziekte symptomen (Parkinson diersmodel). Voordat de dieren meer dan matig ongerief zullen ondervinden worden de humane eindpunten toegepast.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren een injectie krijgen die bepaalde ziekte processen van de ziekte van Parkinson nabootst. Daarnaast zal er bloed worden afgenomen, zullen de dieren onder anesthesie PET scans ondergaan en worden de dieren gedood.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De humane eindpunten zullen worden toegepast, wanneer er duidelijke veranderingen zijn in het gewicht en gedrag van de dieren of wanneer de dieren te veel ziekteverschijnselen vertonen. De verwachting is dat maximaal 5% van de dieren de humane eindpunten zal bereiken.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe

Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdierlijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens

de DEC niet mogelijk.

De complexe structuur van de hersenen is nodig om de ziekteverschijnselen van de ziekte van Parkinson goed na te kunnen bootsen. Bovendien is de evaluatie van PET tracers alleen mogelijk in dieren, omdat de effectiviteit en de specificiteit (opname in de hersenen) van de tracer in het lichaam van cruciaal belang is voor de beoordeling van de tracer. Het is daardoor niet mogelijk deze experimenten uit te voeren in celkweek.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Om de ziekteverschijnselen van de ziekte van Parkinson na te bootsen gebruikt men twee verschillende (MPTP) muismodellen. Een acuut model dat dopamine afname weergeeft en het sub-chronische model dat neurodegeneratie (het afsterven van zenuwcellen) nabootst. Beide modellen zorgen voor activatie van de microglia-cellen, de biologische target van dit project. Tot nu toe blijft het onduidelijk welke type neuroinflammatie van belang is voor de pathogenese en de ontwikkeling van neurodegeneratie in Parkinson. Daarom is het van essentieel belang om zowel de acute als de sub-chronische soort inductie van Parkinson te evalueren.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Door voorafgaande aan de PET tracer evaluatie eerst te bepalen wanneer in de tijd het te verwachten PET signaal optimaal zal zijn, hebben de onderzoekers minder dieren nodig. Daarnaast zal men dezelfde dieren meerdere malen scannen, zodat het aantal observaties per dier wordt gemaximaliseerd.

Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 505 muizen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

De dieren krijgen tijd om te acclimatiseren, worden sociaal gehuisvest en intensief gemonitord. Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe: n.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

Voor dit onderzoek zal men gebruik maken van mannelijke dieren. Vanuit de literatuur is het bekend dat in vrouwelijke muizen de MPTP toxiciteit ernstiger is dan die bij mannelijke muizen. Dit verschil in het toxiciteitslevel tussen mannen en vrouwen verhindert het gebruik van beide geslachten binnen één experiment. Daarnaast zijn de doses en tijdstippen van de MPTP gebaseerd op eerdere experimenten bij mannelijke dieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd.

Na het euthanaseren van de dieren zal men hersenweefsel verzamelen voor verdere analyse, zoals voor autoradiografie. Er worden dodingsmethodes uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is: *n.v.t.*

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag

Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

Bij deze dierproef is de centrale morele vraag: Rechtvaardigt het testen van nieuwe specifieke PET tracers voor het imageren van de activiteit van microglia-cellen, bij de ziekte van Parkinson het gebruik van 505 muizen in de dierproef die daarvan licht tot maximaal matig ongerief ondervinden?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af.

De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden licht tot maximaal matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel

voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: Voordeel vanwege de kennisontwikkeling. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van effectievere behandelmethoden voor Parkinson patiënten.

De DEC is van mening dat de belangen van de wetenschap en de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 505 muizen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van kennis over PET tracers met betrekking tot de ziekte van Parkinson, is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het testen van nieuwe PET tracers, voor het imagen van actieve microglia-cellen, bij een diermodel voor de ziekte van Parkinson. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van nieuwe effectievere behandelmethoden voor Parkinson patiënten is afgewogen tegen het, als maximaal matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 505 muizen en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Het maatschappelijk belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel en het wetenschappelijk belang als reëel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de PET tracers en zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een effectievere behandeling van Parkinson.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk belang en het reële wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 505 muizen en het daarbij verwachte lichte tot maximaal matige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project.

Er is geen dilemma geconstateerd.

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] AMSTERDAM
[REDACTED]

**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
AVD1140020171070

Bijlagen

1

Datum 25 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 17 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease." met aanvraagnummer AVD1140020171070. 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.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 maart 2017. 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. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:

25 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020171070

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.

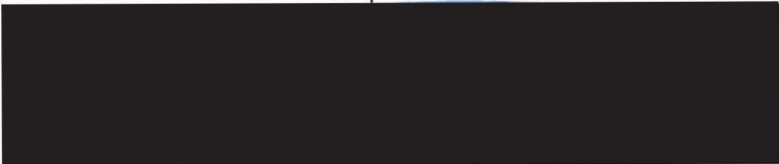
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<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: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam

Adres: de Boelelaan 1117

Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2021, voor het project "New P2Y12 receptor targeting PET tracers as next generation neuroinflammation markers in Parkinson's disease." met aanvraagnummer AVD1140020171070, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 maart 2017, ontvangen op 17 maart 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 PET tracer evaluation in both the acute and subchronic MPTP mouse model				
	Muizen (Mus musculus) /	505	98% Matig 2% Licht	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

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

In artikel 10, lid 1 sub a 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

Aanvraagnummer:

AVD1140020171070

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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:
AVD1140020171070

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD1140020171070

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.