

		Inventaris Wob-verzoek W17-11								
			wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.		document NTS 20171424	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Origineel aanvraagformulier				x		x		
2		NTS initieel			x					
3		Projectvoorstel initieel				x	x	x	x	
4		Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5		DEC-advies				x		x		
6		Ontvangstbevestiging				x		x		
7		Verzoek om aanvullende informatie				x		x		
8		Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x		
9		NTS aangepast	x							
10		Projectvoorstel aangepast				x	x	x	x	
11		Bijlage beschrijving dierproeven aangepast			x					
12		Adviesnota CCD		x						x
13		Beschikking en vergunning				x		x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>50169181</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>616</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD Maastricht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL04 INGB 0679 5101 68</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	50169181	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	Postbus	616	Postcode en plaats	6200 MD Maastricht	IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																	
KvK-nummer	50169181																	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg																	
Postbus	616																	
Postcode en plaats	6200 MD Maastricht																	
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																	
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>	4-6																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	[Redacted]	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]		
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	[Redacted]																
Functie	[Redacted]																	
Afdeling	[Redacted]																	
Telefoonnummer	[Redacted]																	
E-mailadres	[Redacted]																	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Functie</td><td>PhD Student</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	[Redacted]	Functie	PhD Student		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]		
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	[Redacted]																
Functie	PhD Student																	
Afdeling	[Redacted]																	
Telefoonnummer	[Redacted]																	
E-mailadres	[Redacted]																	

- 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 IvD Maastricht ☐ Dhr. ☐ Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres [redacted]@maastrichtuniversity.nl
- 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 01 - 05 - 2017
- Einddatum 01 - 05 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Therapeutische maatregelen om de gevolgen van herseninfarct te verminderen.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-UM
- Postadres Postbus 616, 6200 MD Maastricht
- E-mailadres [redacted]@maastrichtuniversity.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege
☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
☐ Via een eenmalige incasso
☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam _____
 Functie _____
 Plaats Maastricht
 Datum 13-4-2017
 Handtekening _____



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Nieuwe therapeutische maatregelen om de gevolgen van herseninfarct te verminderen.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	infarct, hersenschade, therapie

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	De voornaamste doelstelling van dit project is het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor de behandeling van een herseninfarct, met een innovatieve combinatie van medicijnen. Een herseninfarct is de tweede meest voorkomende doodsoorzaak waarvoor slechts een enkel medicijn beschikbaar is: een bloedprop-oplossend middel. Dit medicijn kan echter maar voor ongeveer 15% van de patiënten worden ingezet omdat het meer dan 30 contra-indicaties heeft, en een hoog risico met zich meedraagt voor
---	---

fatale bloedingen. Wij willen een nieuwe therapie ontwikkelen waarbij met een combinatie van medicijnen schade aan de hersenen kan worden voorkomen. De medicijnen pakken alle drie hetzelfde ziekte-mechanisme aan, namelijk het verminderen van de vorming van schadelijke zuurstofdeeltjes. Ze werken echter op 3 verschillende punten in het proces en daardoor versterken ze elkaars effect. Het behandelingsprincipe dat wij willen toepassen is breed inzetbaar en heeft geen risico op bloedingen. Laboratoriumstudies en eerdere studies in kleine proefdieren hebben reeds aangetoond dat deze combinatie van medicijnen de hersenen beschermt tegen de gevolgen van een herseninfarct.

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

In dit onderzoek zullen we de nieuwe therapie testen in grote proefdieren, meer precies in schapen. Dit is een laatste, essentiële stap alvorens de therapie in klinische studies kan worden getest. Als de uitkomsten van onze studie ook in schapen laten zien dat er een beschermend effect is van de combinatie van medicijnen, kan deze therapie verder worden ontwikkeld voor gebruik in ziekenhuizen. Dit zou betekenen dat er voor het eerst een behandeling voor mensen met een herseninfarct beschikbaar komt, die schade aan de hersenen voorkomt en daarmee uitzicht geeft op een beter herstel en minder gevolgen voor de patiënt na het herseninfarct.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

17 volwassen schapen

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

De schapen zullen een chirurgische ingreep ondergaan, waarbij een herseninfarct wordt opgewekt door het tijdelijk afklemmen van een bloedvat. Hiermee bootsen we de verminderde of afwezige bloeddoorstroming tijdens een herseninfarct bij de mens na. Deze operatie kan het welzijn van het dier beïnvloeden. De operatie kan leiden tot pijn en benauwdheid en wondpijn na afloop. Door adequate pijnstilling en kunstmatige slaap worden deze negatieve gevolgen voor het welzijn beperkt. Antibiotica zullen worden gegeven om eventuele infecties te voorkomen/bestrijden. Daar het een model van het herseninfarct betreft, zullen de dieren ook de gevolgen daarvan ondervinden, net als bij mensen, zoals krachtsverlies en problemen met de motoriek.

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

Tweederde van de dieren (66%) zullen een gematigd ongerief ondervinden. De overige (33%) zullen mild ongerief ondervinden.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren zullen na afloop van het experiment worden gedood waarna de effecten van de nieuwe therapieën op de hersenschade uitgebreid geanalyseerd zullen worden.



4 Drie V's

4.1 Vervanging

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

De gevolgen van een herseninfarct zijn dermate complex en omvat meerdere organen en celtypes en kunnen niet nagebootst worden in proefdiervrije alternatieven. Onderzoek door middel van analyse van verzamelde gegevens en weefsels van patiënten, aangevuld met data uit reeds uitgevoerde dierexperimenten en laboratoriumexperimenten hebben geleid tot een selectie van therapieën die geschikt zijn voor verantwoorde preklinische studies die de situatie in de mens zoveel mogelijk benaderen. Deze experimenten in schapen zijn de laatste stap voordat de therapeutische interventie kan worden getest in patiënten, en zijn derhalve noodzakelijk om de stap naar klinische studies te maken.

4.2 Vermindering

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

Goede statistische onderbouwde studies die gebaseerd zijn op voorgaande experimenten en een gefaseerde uitvoering waarin de experimenten logisch op elkaar aansluiten, gekoppeld aan jarenlange ervaring van een gespecialiseerd onderzoeksteam staan garant voor een wetenschappelijk verantwoorde studie met een minimum aan schapen en een minimum aan ongerief.

4.3 Verfijning

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

De dierproeven zullen worden uitgevoerd in volwassen schapen. Eerdere studies in cellen en kleine knaagdieren hebben al gunstige effecten laten zien van onze voorgestelde therapie. Alvorens we de stap naar de kliniek kunnen zetten, is het testen van de therapie in een groter proefdier noodzakelijk. Er is gekozen voor schapen omdat deze qua grootte en gewicht overeenkomen met de mens. Het model dat wordt toegepast is een reeds bestaand en gevalideerd model dat het herseninfarct en de schade na een herseninfarct bij de mens goed nabootst. Daarnaast is het mogelijk om ook beeldvormende technieken te gebruiken die in de kliniek bij mensen kunnen worden toegepast.

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

Alle dieren krijgen adequate verdoving, pijnstilling en antibiotica om ongerief te voorkomen. Bovendien zullen de dieren zo lang mogelijk in hun natuurlijke omgeving gehouden worden om eventuele stress en angst te verminderen. Alle schapen zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Maastricht University
- 1.3 Provide the title of the project. Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke

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.

Stroke represents currently one of the largest unmet medical needs: It is the second leading cause of death and the first disability worldwide (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>). Almost 2 million people worldwide suffer from stroke every year and more than 1000 drugs have been pre-

clinically tested. However, all attempts to develop an effective drug therapy have failed. Currently, there is only one drug available, a blood-clot dissolving agent (rt-PA) (<http://www.stroke.org/we-can-help/survivors/just-experienced-stroke/stroke-treatments>). However, this drug has over 30 contraindications and bears an extremely high risk of causing fatal bleeding (1). Therefore, 85% of all stroke patients are not treated with it (2). In addition, it is a drug that is only used to take away the cause of the ischemia after it has already happened. There is currently no therapy available to diminish neurological damage to the brain after ischemia.

Therefore, there is a huge need of new therapeutic approaches and redefining drug discovery strategies. The needed innovation would be (i) a drug which is broadly applicable, i.e. has no contraindication, (ii) can be given in all forms of stroke and already in the ambulance, (iii) is safe, i.e. bears no risk to cause secondary bleeding, (iv) is effective and reduces the brain infarct, (v) increases survival and improves neurological outcomes for patients, (vi) and is directly neuroprotective reducing neuronal damage and apoptosis.

Our research addressed the biomedical concept of oxidative stress, i.e. the formation of reactive oxygen species (ROS) which is a fundamental consequence of aerobic life. The dogma was that such ROS are undesirable waste products and even triggers of disease. However, therapies building on so-called anti-oxidants were unsuccessful and even harmful (3). This therapeutic approach could show that the reasons for this were a fundamental misconception of the nature of ROS. In fact, ROS serve essential signaling roles in our body (4-7). Hence, it was to be expected that non-specific scavenging of all ROS with anti-oxidants must have negative consequences. It has been shown that a family of enzymes dedicated to ROS formation, specially NADPH oxidases (NOX) and NO synthase (NOS), is often the main source of ROS and are highly regulated post-ischemia (6, 8). However, we also identify instances where these enzymes become apparently deregulated and can indeed cause disease (9, 10).

By targeting specifically these conditions and only the enzyme subtypes involved with selective drugs together with selectively reversing the damage caused by unwanted ROS, we identified an entirely new approach to the oxidative stress theory and its medical exploitation. We have validated three independent drugs, i.e. NOX and NOS inhibition and sGC activation, that target the same signaling network, but at different positions, and exert a highly synergistic effect in small animal models of stroke, kidney damage or atherosclerosis (*data not published*). Out of the three above possible medical indications for this combination therapy, stroke has the highest unmet need and is therefore chosen for further translation into the clinic. These three drug principles have been validated during the last years in our research group both at the genetic and pharmacological level to be relevant in stroke (**see Figure 1**):

- NADPH oxidase (NOX), an oxygen radical forming enzyme family causing blood-brain barrier breakdown and damage to neurons, which can be prevented by NOX inhibitors (NOXi) (10). There is not enough scientific evidence showing NOX1 as a detrimental enzyme in stroke. Moreover, it has been recently shown that NOX2 seems to play no role in brain ischemia (11),

therefore, NOX inhibition as a therapeutic target will be primarily focus on isoforms 4 and 5. Moreover, it has been described that NOX4 is up-regulated after ischemia (**Figure 2**) what leads to massive ROS production and neuronal damage.

- Nitric Oxide (NO) synthase (NOS), usually a signalling enzyme, which however in stroke is interrupted and instead produces neurotoxic quantities of NO, which can be prevented by NOS inhibitors (NOSi) (9). Similarly to NOX, different NOS isoforms are also up-regulated after ischemia leading to nitrative impairment (**Figure 2**)
- Soluble Guanylate Cyclase (sGC), a protective enzyme, which upon stroke is oxidatively damaged (by both oxygen radicals and NO) to apo-sGC but a drug is available (sGCa), which re-activates this damaged enzyme and thereby is able to reverse or prevent the consequences (*in vivo data unpublished*).

Different representatives of each drug class (NOXi, NOSi, sGCa) were already identified and shown to be highly effective when given alone in different small animal models (9, 10) (**see Figure 3**). Combining the three principles prevents compensatory mechanisms and allows to lower the concentration (or, *in vivo*, dose) of each separate drug. In full combination, our approach, also named network pharmacology, will increase both the efficacy and safety, as the chances for side-effects are reduced by lowering the doses. As a preliminary study, we treated hippocampal brain slices subjected to an ischemic period with sub-threshold concentrations of NOXi, NOSi and sGCa resulting in a clear and significant increase in cell viability (**Figure 4**).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Our therapeutic principle, discovered in the course of the last years (ERC-ADG RadMed) fulfills all above mentioned criteria and is also an innovative approach because we reduce the risk by developing only a single compound by combining three compounds that target the same disease mechanism at different points. We here propose to conduct the final step as a proof of concept (PoC) before a first-in-man study in stroke with the major objective to complete phase III pre-clinical animal trial to provide robust pre-clinical findings for a first-in-man trial in stroke.

References

1. Vandelli L, et al. (2015) Fibrinogen decrease after intravenous thrombolysis in ischemic stroke patients is a risk factor for intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 24(2):394–400.
2. Stankowski JN, Gupta R (2011) Therapeutic targets for neuroprotection in acute ischemic stroke: lost in translation? *Antioxid Redox Signal* 14(10):1841–1851.
3. Schmidt HHHW, et al. (2015) Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxid Redox Signal* 23(14):1130–1143.
4. Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47–95.
5. Kaludercic N, Deshwal S, Di Lisa F (2014) Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol* 5:285.
6. Casas AI, et al. (2015) Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications. *Antioxid Redox Signal* 23(14):1171–1185.
7. Ghezzi P, Jaquet V, Marcucci F, Schmidt HHHW (2016) The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. *Br J Pharmacol*. doi:10.1111/bph.13544.
8. Radermacher KA, et al. (2013) Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of

oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 18(12):1418–1427.

9. Kleinschnitz C, et al. (2016) NOS knockout or inhibition but not disrupting PSD-95-NOS interaction protect against ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab*:0271678X16657094.
10. Kleinschnitz C, et al. (2010) Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* 8(9):e1000479.
11. Kleikers PW, et al. (2015) A combined pre-clinical meta-analysis and randomized confirmatory trial approach to improve data validity for therapeutic target validation. *Sci Rep* 5:13428.
12. Stover JF, et al. (2014) Nitric oxide synthase inhibition with the antipterin VAS203 improves outcome in moderate and severe traumatic brain injury: a placebo-controlled randomized Phase IIa trial (NOSTRA). *J Neurotrauma* 31(19):1599–1606.
13. Pedernera C, Ruiz JL, Castells G, Manteca X, Cristòfol C (2007) HPLC quantification of perphenazine in sheep plasma: application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 854(1-2):308–312.

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?

As previously described, stroke is a public health problem with unmet medical needs which requires to be scientifically addressed. Following target identification and pre-clinical experiments using brain ischemia in vivo models, we have recently identified NOX, NOS and sGC as three promising therapeutic approaches against stroke. Therefore, the major research question is to demonstrate that a combinatory therapeutic approach by targeting different components of the NOX-ROS-cGMP oxidative stress pathway, reduces infarct volume and improves neuro-motor functioning and prognosis.

3.3 Relevance

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

Stroke caused 6.7 million deaths all over the world just in 2012 (WHO report). In the past decades, cerebrovascular diseases have emerged as an epidemic problem which are projected to keep growing in the coming years. Patients of all ages are affected by stroke, from newborn babies to adult patients and the lack of treatment options is also common to all ages. Therefore, there is a huge medical and social need of defining new therapeutic targets and further pharmacological treatments which allow direct improvement in patient outcome. Brain ischemia is a multi-factorial disease composed of several cell mechanisms leading to apoptosis, necrosis, neuronal death and significant tissue damage. Therefore, in stroke, extremely strong neuroprotection agents to maximally reduce brain tissue damage are required. Hence, a multi-factorial disease demands a complex multi-factorial approach which has been developed over the past decades in our group. We present a promising combinatory therapy that could prevent several pathomechanistic changes after stroke.

Therefore, the main purpose of this research project is to take the necessary step of a large animal study

for translating a novel innovative combination therapy for stroke to the clinics.

The end goal of the whole project is to meet a high medical need with an innovative drug combination in patients with stroke for which the animal study will give a proof of principle. The proposed animal study is in line with a long track record of *in vitro* and *in vivo* data which support the concept (see Figure 2).

3.4 Research strategy

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

The here proposed experiments are part of a larger continuum that started with *in vitro* models of brain ischemia (rat hippocampal brain slices subjected to oxygen glucose deprivation) and *in vivo* small animal experiments (other PV). We now want to proceed to the next step of a large animal before eventually going for clinical trials. In this PV, a stroke model will be employed in sheep. Drug dosing and administration routes are based on pre-existing pharmacokinetics and pharmacodynamics data in human for NOSi (12), in sheep for NOXi (13) and mouse data for sGCa (confidential company data).

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.

Experiments in this PV will consist of an ovine experimental stroke model.

1. Before starting the surgery, all animals will be subjected to 2-weeks acclimation period. Within these weeks, a 7-day pre-test period will take place to ensure good animal health and provide baseline measurements.
2. To minimize variation with respect to age, 17 sheep at ~ 1 year of age (9 to 21 months) will be employed as an ovine model of transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO). The occlusion of the middle cerebral artery will last for 3.5 to 4 hours and subsequently reperfusion is allowed. This occlusion period usually leads to a profound core infarction, but still leave a considerable penumbra as a primary therapeutic target. Animals are intubated and anaesthetized via tracheal respiration. During surgery all physiological parameters are continuously monitored.
3. Following the ischemia period one group of animals will be injected with the combination of the previously selected drugs (NOXi, NOSi, sGCa). Similarly, a second group of stroke-operated animals will be treated with vehicle solution. A sham group will be used for assessing possible other effects of the treatment.
4. After surgery and treatment injection, animals will be monitored for 1 month including regular assessments of neurological functions, lesion volumetry, cerebral blood flow and metabolic state of brain tissue. In this 4-weeks surveillance period post-treatment, also possible side effects can be detected. However, the latter is highly unlikely as so far no relevant side-effects have been observed, including in the clinic (compounds used for other indications).
5. Finally, at day 28 all animals will be sacrificed and brains will be preserved for further molecular biology analysis.

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.

Previous attempts to translate experimental neuroprotective therapies into clinically applicable therapies have been hampered by the translational roadblock. A particular promising solution to prove a particular

therapeutic concept is to conduct experiments in large animals. Those are not meant to repeat previous rodent work, but to verify obtained results in a gyrencephalic species, which exhibits a body weight and size similar to human patients which allows to use the same equipment and techniques as in humans. Moreover, large animals are feasible for imaging studies using clinical equipment and including sophisticated molecular imaging techniques which could help in pharmacological treatment validation. Next to addressing efficacy endpoints, large animals also provide additional safety information from a third species before ultimately moving forward to phase IIa clinical investigations. Although large animal experiments are significantly more laborious, they help to prepare early stage clinical trials. Thus, we will employ an ovine model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by a combinatory drug therapy which is able to modulate different pathomechanisms directly linked to neuronal damage and poor outcome.

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	Cerebral hypoxia-ischemia
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'.	10700	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Cerebral Hypoxia-Ischemia

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We will use the ovine stroke model to test our combinatory neuroprotective therapy in a large animal species, as necessary step before proceeding to clinical trials. After the surgical procedure, animals will be kept within 4 weeks where infarct size, neurological function, cerebral blood flow and metabolic state will be used as outcome parameters. These parameters are clinically the most relevant to assess the effect of our neuroprotective therapy and can also be directly translated to a possible clinical trial afterwards.

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

We want to perform a stroke model in sheep by a transient occlusion of the middle cerebral artery (MCA). Briefly, the skin between the ear and eye was incised on the left side of the head to expose the branches of the superficial temporal artery and the accompanying vein. After occlusion of these vessels, the origin of the temporalis muscle was incised at the temporalis line and the muscle was carefully elevated from the parietal bone. After exposure of the skull bone surface, a hole is drilled into the parietal plate. On local incision of the dura mater, MCA or its branches are clipped during the ischemia period (3,5h to 4h. Then, the clip is removed after the desired ischemia time. Within 4h of tMCAO, vessel

occlusion will be verified by intraoperative imaging (MRI/PET). During surgery and postoperative imaging, body temperature, blood pressure, heart rate, base excess, blood gas, as well as general anesthetic parameters will be recorded. Pre- and post-surgical antibiotic treatment will be administered.

Behavioral phenotype will be tested in the animals at the times -0.5h (before surgery), + 4h and + 12h after substance application. Already within the adaptation phase, the animals are thoroughly accustomed to dealing with the performing staff (for example, by recording clinical parameters and feeding), which means that necessary hand movements do not have a surprising effect on the animals during the experimental period. The behavior test itself does not cause any physical pain and is performed as gently as possible as well as in a quiet stable area. The burden of the animals by the planned behavioral test can be classified as very low.

Detailed procedure is as follows:

Evaluation	Implementation/Execution
1. Consciousness	Observation of the animal in calm and movement (animal responsiveness, communication with species, feed intake, etc.)
2. Attitude assessment a. Ataxia (uncoordinated movements) b. Torticollis (head skew) c. Overcatting (unphysiological footing on the fetlock joint)	Observation of the body (at rest and in motion) and gait with and without sight
3. Positioning and positioning reactions a. Correction reaction b. Bounce reaction c. Wheelbarrow test	a. Front and hind legs are passively overkilled by the examiner (foot on the fetlock joint) or placed on a stable support. Then, the support is carefully pulled to the side. The time for the correction to the physiological position is evaluated. b. To be carried out with the front and rear legs (one leg each), in which case an extremity is lifted (no contact with the ground). By slow pressure or pull on the shoulder or the pelvis the animal reaches a relative oblique position (maximum 55° angle to the ground). The subsequent physiological correction by hopping with the opposing limb is examined and evaluated. c. Raise the hindquarters by enclosing the flank. Both hind legs do not make contact with the soil. The animal only loads the front legs and is carefully pushed forward. The judgment of the posture of the head and of the step (front legs) and step direction is made.

After the surgery, animals will be monitored for 1 month while these behavioral tests were performed. Finally, at day 28 all animals will be sacrificed and brains will be preserved for further post-study necropsy and molecular biology analysis.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into

account to minimise the number of animals.

We will use a power analysis according to the formula $n = 2 \times s^2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 / D^2$ (L. Sachs, Angewandte Statistik, Springer, 1983, Berlin, Springer Verlag), an α of 0.05 and β of 0.8, a minimal statistically assessable treatment effect (D)=55% at a standard deviation (s)=30%, this implies that, at a power of 80%, the minimum number of animals is $n = 15,7 \times (s)^2 / (D)^2$ per group.

B. The animals

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

Species and origin

Sheep will be used from the breeder who has been supplying the animal facility of the University of Maastricht. Animals from 9 to 21 months of age will be used to minimize variation with respect to age. As previously described, sheep studies are ethically less problematic than non-human primate experiments. Moreover, body weight and size in sheep are similar to human patients which allows to use the same imaging equipment and techniques as in human.

Number of animals to be used

We will also taking into account a drop out of the stroke animals of 10% (mortality or excluded animals):
 $n = 15,7 \times 0,3^2 / 0,55^2 = 4,67 / 0,9 = 5,18 \sim$ **6 animals/group** and **5 animals/group** non considering drop-out (sham).

A total of 17 animals are foreseen to be used, allocated to 3 groups:

- Sham group ($n=5$)
- Stroke group with combination treatment ($n=6$)
- Stroke group with placebo ($n=6$)

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: Due to the complexity of cerebrovascular disorders, a complete **replacement** of animal experiments is still impossible without sacrificing human patient safety in the field. However, our research consortium has obtained relevant information on the therapeutic paradigm in previous in vitro studies, which were completed by selected and carefully performed in vivo (rodent) trials. Only those questions which necessarily need to be answered in large animal trials will be investigated.

Moreover, the use of sheep has been suggested by the European Medical Agency (EMA) to pharmaceutical companies in order to show in vivo the safety and feasibility of the new drug. It is unacceptable to test directly in humans based on exclusively in vitro data by the standards of EMA and

by good clinical practice.

Reduction: We use expert biomedical sample size calculation methodology for **reduction** of animal numbers to the required minimum. This is enabled by the focus on primary endpoints and derivation of relevant biomedical parameters from previous experiments. Due to large experience with sheep we are able to increase the number of animals that successfully reach the end of their experiments. Due to the expertise and experience of our team we have low numbers of drop-outs, which reduces the numbers of animals in the experimental groups. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. In order to reduce the number of animals, we only use rams; since the female animals are better protected against hypoxia-ischemia it would be more difficult to see an effect of our therapy.

Refinement: For **refinement** our experiments, we rely on almost 1.5 decades of experience in the field, characterized by a continuous refinement of all experimental procedures, invasively or non-invasively, conducted to augment (i) animal welfare, (ii) reproducibility, (iii) external and internal validity, and (iv) translational relevance of the protocol. Experiments will be performed according to STAIR and, wherever possible, to ARRIVE criteria. Animals will be subjected to behavioral phenotyping, serial PET and MR imaging, frequent screening of physiological parameters and a detailed post-study necropsy to gain the maximum information yield possible from an individual experiment. Non-recovery experiments have been also considered, however, from a translational point of view, this approach does not make any sense when only clinically relevant endpoints such as infarct volume, behavior and brain metabolism can be investigated. This is almost impossible in non-recovery studies as (i) lesion development and functional recovery take time in the range of days to two weeks and (ii) observation periods >24h cannot be achieved in anesthetized subjects. Moreover, animals tend to become highly unstable under prolonged anesthesia (>12 hours). Our experiments will be conducted by a highly trained staff that can recognize and prevent discomfort. Moreover, we aim to leave the sheep as much in their natural environment as we can with minimal human contact.

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

Before induction of cerebral hypoxia-ischemia the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water ad libitum. After induction of hypoxia-ischemia the sheep are housed in groups with access to food and water ad libitum.

The sheep will be checked daily for discomfort due to inflammation. Analgesia will be used during the whole procedure to reduce the animals' discomfort. Moreover, analgesia will be also applied to reduce sheep discomfort post-surgery for at least 4 days. Pre- and post-operative antibiotics will be administered, in order to prevent (progression of) (wound) infection.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling).

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

☒ No

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

After returning the animals to the stable, they are socially housed and are monitored clinically until they are completely re-awakened. For the further duration of the experiment, the animals are monitored twice a day, whereby at least once a day the general condition, respiratory rate, heart rate, body temperature and mucosal color are recorded according to the scoresheet.

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.

Adequate analgesia will be applied to reduce sheep discomfort post-surgery for at least 4 days (1).

Ref: J. Henke et al. Expert information: Committee on Anaesthesia of GV-SOLAS. Pain management for laboratory animals. Status: May 2015.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Stroke is a severe disorder and the model procedure itself is demanding to the animal. Weight loss between 5 and 8% can be observed on occasion following very severe MCAO. The functional consequences of stroke are somewhat mitigated by the fact that pyramidal fibers do not cross completely in the ovine brain. Stroke therefore induces hemilateral weakness and slight motoric dysfunction, but does not

leave the animal hemi-plegic or hemi-paralyzed as would be the case in primates including humane.

Wound infection can occur after all surgical manipulation, for which appropriate measures will be taken (antibiotics).

Survival rates of the MCAO procedure in sheep clearly exceed 90% under expert care and animals usually recover from post-surgical stress within 2 to 3 days.

Explain why these effects may emerge.

The neurological symptoms that we describe are inherent to the model used and are a sign of the ischemic damage to the brain.

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

All experiments will be conducted by a team of highly skilled veterinarians and bio-technicians. Trained veterinary assistants and bio-technicians will reinforce the team. The team relies on a sophisticated protocol of pre-, peri- and postsurgical stress and pain management, which has been refined together with experts from Animal Welfare agencies and senior veterinary experts over almost a decade. The protocol (details available upon request) relies on multi-drug treatment and is a fixed element in all sheep MCAO studies conducted by the team.

Moreover, animals will be subject to a 24-hour surveillance by veterinarians and/or trained bio-technicians with bihourly visits and welfare checks during the first two days after surgery. Thereafter, animals will be checked for at least three times a day and twice (until day 7) or once (thereafter) during the night.

All invasive procedures, imaging and animal transportation will be conducted under full anaesthesia/ventilation as well as continuous veterinary surveillance and assessment of vital science and physiological parameters.

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.

Humane endpoints:

- Paralysis
- *Sepsis/ infection not responding to treatment:*
 - o **Local (at the site of operation):** redness, pain, and swelling (with or without pus) with local antiseptics or antibiotics are considered a humane endpoint. No improvement after antiseptics/antibiotics treatment after 10 days of treatment is also considered an endpoint.
 - o **Systemic:** Excessive lethargy, time lying down, weight loss > 15%
 - o **Stroke-related:** unable to eat, convulsions, stupor, inability to move
- *Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)*

Indicate the likely incidence.

Humane endpoints are seen in maximally 10% of the experiments

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').

Intervention	Discomfort (Stroke groups – Placebo/treatment)	Discomfort (Sham group)
tMCAO	2 (Mild)	2 (Mild)
Injection compounds	2 (Mild)	2 (Mild)
Survival after stroke	3 (Moderate)	2 (Mild)
Vital measurements	2 (Mild)	2 (Mild)
Neurological assessment	2 (Mild)	2 (Mild)
MRI	2 (mild)	2 (mild)
PET	2 (mild)	2 (mild)
Sacrificing	2 (Mild)	2 (Mild)
Total discomfort	Moderate	

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The ram will be euthanized since we cannot reuse him since vital organs (i.e. brain) have to be sampled for analysis.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

☐ No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

☒ Yes

DEC-advies PV 2016-017/ [REDACTED]

Preambule:

De vragen en de bijbehorende antwoorden, **zie grijze markeringen**, doen wij U vertrouwelijk toekomen indachtig op artikel 10 lid 1 aanhef en onder f en g van de Wet Openbaarheid van Bestuur.

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke.*
3. **Titel van de NTS:** *Therapeutische maatregelen om de gevolgen van herseninfarct te verminderen.*
4. **Type aanvraag:**
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC: *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]@maastrichtuniversity.nl
6. **Adviestraject** (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC; 15-02-2017
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☒ in vergadering besproken; 24-02-2017
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met maximaal 15 werkdagen
 - ☐ aanpassing aanvraag
 - ☐ advies aan CCD
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD. Zie ook de verklaring van de vertegenwoordiger van de vergunninghouder onder punt 6 ondertekening van de aanvraag.
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum; 05-03-2017

- Gestelde vragen en antwoorden:

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Algemene vragen/opmerkingen:

1. De DEC UM verzoekt U de claims, gemaakt in deze paragraaf, wetenschappelijk te onderbouwen, bijvoorbeeld in de vorm van verwijzingen naar wetenschappelijke literatuur of in het geval van ongepubliceerde data: figuren uit eigen onderzoek die de claims ondersteunen.

De DEC-UM heeft derhalve moeite het belang en de waarde van het door U aangevraagde onderzoek in te schatten.

Answer: Specific references regarding already published findings and preliminary data from our group are now include along the application.

Stroke is the second cause of death and the first one of disability worldwide. However, only 10% of the patients can be treated while the rest (90%) have no treatment option at all.

Therefore, there is a huge medical and social need of new pharmacological treatments which reduce neuronal damage and enhance motor outcomes post-stroke. Here, we present the first combinatory therapy for stroke which based on our preliminary data lead to direct neuroprotection and improved motor-functioning. Thus, we are addressing a high-priority social need within industrialized countries.

Voorbeelden zijn:

1. U claimt dat er momenteel maar 1 medicijn beschikbaar is/geen behandeling is voor herseninfarcten. Heeft U hier wetenschappelijke verwijzingen over?

Answer: There are several published studies where this statement is included. Some references and links to different websites are now included in the main proposal.

2. U claimt dat ROS essentiële signaalmoleculen zijn in ons lichaam, de gegeven referentie verwijst echter naar een artikel over het effect van vitamine E, een antioxidant, is dit de meest relevante literatuur op dit onderwerp?

Answer: We definitely agree that the provided reference was not the most relevant in the field. More pertinent and suitable references are now included in the main proposal mainly focus on the physiological role of ROS in the body as a key signaling molecule and its potential pathological effect.

3. U suggereert dat deze techniek operationeel is in Maastricht. Is zulks het geval? U suggereert dat Uw groep resultaten heeft behaald, maar verwijst vervolgens naar literatuur waarin Uw groep niet voor lijkt te komen? Kunt U onderbouwen of U de expertise heeft die benodigd is om dit onderzoek uit te voeren?

Answer: We have a close collaboration with one of the most experienced groups in Europe with regard to stroke models in large animal experimentation. Our collaborators have been publishing several papers within the last years in this field. Therefore, our experienced collaborators will perform, lead and teach our group how all procedures should be properly conducted.

4. U heeft het over NOS-remmers. Gaat U alle drie de vormen remmen of richt U zich specifieker op een van de drie NOS?

Answer: Based on our preliminary in vitro data all three NOS isoforms (neuronal, endothelial and inducible) are up-regulated after ischemia (Figure 2a-b). Therefore, a global inhibition of NOS lead to a significant reduction of infarct volume (See Figure 3)

5. U claimt dat glucose gevaarlijk is in ischemische hersenen, kunt U dit onderbouwen?

Answer: It has been described in many clinical studies that glucose administration after brain ischemia leads to impair neuro-motor functioning and increased infarct volume.

However, we decided to remove this therapeutic approach from the application, therefore, all information about glucose has been deleted from the application.

6. De DEC-UM zou hier graag een betere onderbouwing zien van wat men gaat geven en waarom, het lijkt een combinatie van 4 stoffen, maar op basis van welke data bent U tot deze keuze gekomen? U geeft aan dat NOX 1 en 2 niet zinvol zijn verder te onderzoeken, maar U richt zich nu in het algemeen op NOX en NOX5 remmers. Kunt U onderbouwen waarom op deze twee? Waarom verwacht U hier wel effecten?

Answer: Since there are more than one question in this point we decided to split up the reply.

- a) *We want to use a combination therapy including a NOXi, NOSi and sGCα in the same treatment as we describe in Figure 1. We based our target selection on years of experience in the field and robust in vitro data which validate the treatment as a promising therapy for stroke. This data is now included in Figure 4 together with a broad explanation in the figure legend.*
- b) *We are mainly focus on NOX4 and NOX5 because both isoforms play a major role in stroke pathophysiology. Based on the literature it is not clear whether NOX1 is involved in stroke since totally opposite data can be found. Regarding NOX2, we have been recently published a meta-analysis demonstrating that NOX2 play no role in stroke. Reference included in the main proposal.*
- c) *NOX4KO animals present a significant reduction in infarct size in comparison with control animals (reference included in the main proposal). Contrary, NOX5KI mice shows worst outcome after brain ischemia (paper in preparation), therefore we believe that NOX4 and NOX5 inhibition would be a promising therapy in large animals.*

3.2 Doel

Vraag:

1. De DEC-UM vraagt zich af of de effecten zoals beschreven direct of indirect zijn, en maakt dat voor Uw hypothese iets uit, kunt u hierop uw visie geven?

Answer: The effects of the model are clearly direct since we will evaluate less infarct volume using imaging techniques (MRI and PET) together with neuro-motor function assessment.

3.3. Belang

Vragen:

1. Hier schrijft U dat herseninfarcten op alle leeftijden voorkomen. Later in de aanvraag wordt duidelijk dat U de experimenten wilt doen in schapen van 1 jaar oud. Is dit de meest relevante leeftijd? Verwacht U dezelfde effecten in alle leeftijden? Is het denkbaar dat de combinatietherapie goed uitpakt bij bv. ouderen, maar gevaarlijk is voor neonaten?

Answer: We will use animals from 9 to 21 months approximately. We need animals where the development of the brain is completed but not considered as elderly adults. In that case the structure and thickness of the skull is too thick making the access to the surgical area almost impossible. Moreover, the variability and standard deviation in these animals is much higher. Within this study we want to mimic as much as possible the human clinical situation where mostly elderly suffer from brain ischemia. The likelihood of neonates suffering from stroke is almost none, therefore, this combination treatment will be always used in adult animals.

2. U claimt hier dat de hier voorgestelde dierstudie voort borduurt op jarenlange 'track-record' van *in vitro* en *in vivo* data die het concept ondersteunen. Kunt U de belangrijkste publicaties die deze claim ondersteunen als referentie opgeven?

Answer: Validation of NOX4 and NOS as potential targets for brain ischemia has been published and all references are now included in the main proposal. Regarding the combinatory therapy, no complete set of data has been published yet due confidentiality and patent issues. Therefore, we include Figure 4 (main proposal) where we describe the beneficial effect of the combinatory therapy using an in vitro ischemia model. Moreover, separate treatments with NOXi, NOSi and sGCa using an in vivo stroke model are also included in Figure 3.

3.4.2

Algemene opmerking:

1. De volgorde van de beschreven handelingen lijken willekeurig. Zou U dit aan willen passen naar een meer chronologisch geheel?

Answer: We agree that the different procedures and handlings were not fully clear in terms of chronological distribution. We made some changes to solve this issue.

Vragen:

1. U wilt de variatie minimaliseren door dieren te nemen van ca. 1 jaar oud. In hoeverre zijn hormonen van invloed op de effectiviteit van Uw therapie? Schapen van 1 jaar oud zijn qua levensfase vergelijkbaar met pubers. Is dit de meest relevante leeftijd voor uw onderzoek naar herseninfarcten? Hebben pubers de meeste herseninfarcten?

Answer: As we previously mentioned, because of technical reasons we will use animals from 9 to 21 months approximately in order to perform reproducible and valid surgeries. Based on the clinical data, stroke mainly occurs in elderly people; however, due to technical issues it is not possible to perform the surgeries in elderly sheep.

2. Waar gaat U precies op letten als het gaat om bijwerkingen?

Answer: Since we do not expect any side-effect based on our preliminary in vivo experiments we will equally monitor treatment and vehicle animals mainly focusing on behavioral phenotyping and imaging measurements (PET, MRI) and compare the outcome obtained.

3. Is het genoemde hersendeel het meest relevante hersendeel voor herseninfarcten, kunt U dat onderbouwen?

Answer: Both hemispheres of the brain will be important for the late analysis after sacrificing since we should compare the stroked hemisphere with the non-stroked one. However, our main outcome will be focused on the reduction of infarct volume after the ischemia period. We will also collect brain tissue for later analysis such as WB, qPCR, IHC, etc.

4. U beschrijft dat U alles in combinatie gaat testen, test U bijvoorbeeld ook glucose alleen, of alleen i.c.m. NOX? Zo nee, zou dat een waardevolle toevoeging kunnen zijn?

Answer: As we previously said, we completely delete glucose from this proposal since the preliminary data was not clear at this point.

3.4.4

Appendix 1

Algemene opmerkingen:

1. De DEC-UM mist een beschrijving van de experimenten die U aanvraagt. Het is op dit moment daarom niet mogelijk in te schatten wat de welzijnsaantasting van de dieren zal zijn gedurende de experimenten.

Answer: A detailed description of the animal procedure has been included in the appendix. I hope this explanation would help to a better understanding of the complete animal experiment.

2. U beschrijft dat U neurologische metingen doet, welke en hoe scoort U die?

Answer: Phenotype behavior link to neuro-motor function will be evaluated using different tests. Detailed explanations of the different tests/exercises have now been included in the appendix section A.

Vragen:

D. Vervanging, vermindering en verfijning.

1. Onder 'verfijning' noemt U nogal wat handelingen die U wilt gaan doen met de dieren die niet eerder in het voorstel zijn benoemd. Dit moet onder onderdeel A al beschreven zijn. De DEC-UM vraagt U dit aan te passen.

Answer: All handlings and animals procedures included in the refinement section have been included in the appendix, section A.

F. Huisvesting en verzorging.

2. De DEC-UM zou hier graag meer informatie willen over de huisvesting van de dieren, met name na de operatie. Het is onduidelijk waar U de dieren in een groep zult gaan huisvesten en hoe U dan in staat zult zijn de dieren te monitoren.

Answer: Detailed explanation about housing and monitoring the animals after the surgery have been included in the appendix, section F.

3. U zegt hier voor het eerst dat U de dieren minstens 4 dagen pijnstilling zult geven. Eerder in het voorstel wordt gesuggereerd dat U de dieren gedurende het experiment analgesie zult geven. De DEC-UM vraagt U dit te verduidelijken.

Answer: Analgesic treatment has been clarified and make it coherent along the appendix.

J. Humane eindpunten.

4. Onder 'local': U zegt dat een humaan eindpunt bereikt wordt wanneer er geen verandering optreedt na toedienen van antibiotica. Binnen welk tijdsframe?

Answer: Time-frame has been included in the appendix, section J.

5. Onder 'systemic': hier leest de DEC-UM voor het eerst dat de dieren gewogen zullen gaan worden?

Answer: Animals will be weighed before the surgical procedure. In case that after the surgical procedure the animals shows singles of deep weight loss, the sheep will be then weighted again. If the weight loss is >20%, it will be considered as an humane endpoint.

6. Hoe weet men of een schaap pijn heeft?

Answer: To evaluate whether the animals are suffering from pain, we will monitor systemic and phenotypic behavioral such as excessive lethargy, time lying down, weight loss >15%.

7. De DEC-UM vraagt zich af hoe het komt dat U hier verwacht dat ongeveer 5% van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken, terwijl U bij het berekenen van de dieren aantallen uitgaat van een uitvalspercentage van 10%, kunt U dat verschil toelichten?

Answer: This mistake has now been solved in the appendix, section J.

K. Classificatie van ongerief.

8. U geeft hier aan dat het totale ongerief dat U verwacht bij de dieren 'mild' is. In de bijgevoegde tabel is aangegeven, dat het overleven na het infarct, matig ongerief geeft. Het totale ongerief kan dan daarmee volgens de DEC-UM niet lager zijn dan 'matig' voor de dieren die een infarct hebben gehad. Verder vraagt de DEC-UM zich af of U de scans ook onder anesthesie zult doen? Wanneer doet u deze en hoe vaak?

Answer: The expected total discomfort for the animals has now been changed in the appendix, section K. Regarding the scans, they will be done two times under anesthesia, the first one 1,5h after reperfusion and later before the sacrificing.

- Datum antwoord; 07-04-2017
- Verstreckte antwoorden; zie hierboven.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts: **N.V.T.**

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **JA**
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.

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC-UM vertrouwt erop 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 bovenstaande is de DEC-UM 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).

Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van translationeel onderzoek.

Belangen en waarden

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

Het directe doel van het project is aantonen dat, bij een beroerte, een combinatietherapie die verschillende onderdelen van het NOX-ROS-cGMP oxidatieve stress mechanisme beïnvloedt, het infarctvolume reduceert en het neuro motorisch functioneren en de prognose verbetert.

Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een nieuwe therapie bij beroerte.

Het betreft hier een translationeel project.

Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC-UM acht het waarschijnlijk dat er belangrijke stappen richting het uiteindelijke doel gezet kunnen worden binnen de duur van dit project.

De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn.

Uit de aanvraag blijkt dat nieuwe therapieën bij beroerte noodzakelijk zijn om de levensverwachting te vergroten en het neuro motorisch functioneren van patiënten te verbeteren en dat daar op dit terrein ook behoefte aan is. Het therapeutische arsenaal bij beroerte is op dit moment beperkt. De DEC-UM is derhalve van mening dat het directe doel, het aantonen dat bij een beroerte een combinatietherapie die verschillende onderdelen van het NOX-ROS-cGMP oxidatieve stress mechanisme beïnvloedt, het infarctvolume reduceert en het neuro motorisch functioneren en de prognose verbetert, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

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 toegepast wetenschappelijke project, dat gericht is op het ontwikkelen van een nieuwe therapie bij beroerte, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep, d.w.z. personen die een herseninfarct hebben gekregen en hun naasten, de medische wetenschap en de maatschappij als geheel.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Ze zullen licht en matig ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen en delen met de medisch-wetenschappelijke gemeenschap. De onderzoekers vergaren kennis over de mogelijkheid om met een combinatietherapie, die verschillende onderdelen van het NOX-ROS-cGMP oxidatieve stress mechanisme beïnvloedt, de gevolgen van beroerte te beperken.

Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Verbeterde therapie en vergrote levensverwachting. Daardoor zal ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Herseninfarct is een belangrijke doodsoorzaak bij volwassenen en is ook een belangrijke oorzaak van neurologische schade met alle gevolgen voor de rest van het functioneren van dien. De therapeutische mogelijkheden voor patiënten met een herseninfarct zijn beperkt en in de laatste jaren ook niet verbeterd.

Mocht de onderzochte combinatietherapie een positief effect laten zien, dan zijn klinische studies met deze therapie op afzienbare termijn mogelijk. Vermindering van de gezondheidsschade van personen die een beroerte hebben gehad, kan ook gunstig zijn voor de maatschappij als geheel, door een verminderd beroep op de gezondheidszorg en betere mogelijkheden voor reïntegratie.

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

Voor zover de DEC-UM de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen is het vooral de samenwerking van de onderzoeksgroepen die de kennis en kunde hebben over dit experimenteel model en die het de onderzoeksgroep zal aanleren, mede gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering, alsmede de aandacht voor de drie V's.

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

De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe. **N.V.T.**
10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt F in de bijlagen.

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

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

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 door: De experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind van de proef.

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.

Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

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

De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

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.

Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse.

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

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

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.

Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

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.

De aanvrager zal in het project gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. De DEC-UM is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met dergelijke dieren uit te voeren.

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.

Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

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?

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het onderzoeken van een veelbelovende combinatietherapie die schade aan de hersenen beperkt na een beroerte, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke".

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel.

Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *matig nadeel*.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel*.

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *substantieel voordeel*.

Algemeen: *relevante groei van medische kennis*.

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en van personen die zijn getroffen door een herseninfarct en hun naasten in het bijzonder binnen het project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke", zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na licht of matig ongerief.

De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën bij beroerte. Voor patiënten en hun naasten is het belangrijk dat er therapieën beschikbaar komen die de schade ten gevolge van beroerte beperken. Dit vermindert het risico op overlijden en de ernst van de ziektelast voor patiënten en draagt zo bij aan de verbetering van kwaliteit van leven voor patiënten en hun naasten.

Er is op dit moment ook behoefte aan therapieën die de schade van een herseninfarct beperken, aangezien de toepasbaarheid van het huidige therapeutische arsenaal gering is. Mocht de onderzochte combinatietherapie ook bij grote proefdieren een positieve uitwerking hebben, dan kan deze therapie verder worden ontwikkeld richting toepassing in de kliniek.

Op grond van deze argumenten acht de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

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

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het onderzoeken van een veelbelovende combinatietherapie die schade aan de hersenen beperkt na een beroerte, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke?" bevestigend.

Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergaan ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen is het vooral de samenwerking van de onderzoeksgroepen die de kennis en kunde hebben over dit experimenteel model en die het de onderzoeksgroep zal aanleren. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning.

De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden.

De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "Targeting Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is **unaniem** tot stand gekomen.

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.

N.V.T.

Daarenboven is de DEC-UM niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD1070020171424

Bijlagen

2

Datum 14 april 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 april 2017. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1070020171424. 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:

14 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1070020171424

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
14 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020171424

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10700
Naam instelling of organisatie: Universiteit Maastricht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 50169181
Straat en huisnummer: Minderbroedersberg 4-6
Postbus: 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
IBAN: NL04 INGB 0679 5101 68
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Maastricht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 
Functie: 
Afdeling: 
Telefoonnummer: 
E-mailadres: 

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: PhD Student
Telefoonnummer: [REDACTED]

Datum:
14 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020171424

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

E-mailadres: [REDACTED]@maastrichtuniversity.nl

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 mei 2017
Geplande einddatum: 1 mei 2022
Titel project: Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke
Titel niet-technische samenvatting: Therapeutische maatregelen om de gevolgen van herseninfarct te verminderen.
Naam DEC: DEC-UM
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD Maastricht
E-mailadres DEC: [REDACTED]@maastrichtuniversity.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: ☒ [x] Projectvoorstel
☒ [x] Beschrijving Dierproeven
☒ [x] Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: ☒ [x] DEC-advies

Ondertekening

Naam:

Functie:

Plaats:

Datum:



Maastricht

13 april 2017

Datum:

14 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD1070020171424



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD1070020171424

Bijlagen

2

Datum 14 april 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 14 april 2017

Vervaldatum: 14 mei 2017

Factuurnummer: 171424

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1070020171424	€ 1035,-

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD1070020171424

Datum 25 april 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 13 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" met aanvraagnummer AVD1070020171424. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Ondertekening

Van uw aanvraag is het originele aanvraagformulier nog niet ontvangen. Wij hebben ook het aanvraagformulier met de 'natte handtekening' nodig. Wij verzoeken u het aanvraagformulier voorzien van de juiste handtekening en aan ons te sturen.

Onduidelijkheden

De sham-groep zal licht ongerief ondergaan, dit betreft 5 dieren van de 17 ofwel 29% van de dieren. In de NTS is aangegeven dat 33% van de dieren licht ongerief zal ondervinden. Kunt u dit in de NTS aanpassen, of aangeven dat 33% klopt en dit uitleggen?

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Datum:
25 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020171424

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:

- Melding bijlagen

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 7 juni 2017 16:41
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanvulling AVD1070020171424

Beste [REDACTED]

de betaling is door interne communicatiefouten vertraagd, maar is nu voorzien voor aanstaande vrijdag.

Met vriendelijke groet,

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: woensdag 7 juni 2017 16:27
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]
Subject: RE: Aanvulling AVD1070020171424

Geachte [REDACTED],
Op 13 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" met aanvraagnummer AVD1070020171424. De CCD heeft een besluit genomen over uw aanvraag.
De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de leges hebben ontvangen.

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

Met vriendelijke groeten,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 6 juni 2017 18:19
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: Aanvulling AVD1070020171424

Dear members of the committee,

Thank you very much for the comments. Please accept our apologies for the delay.

We have changed the percentages as indicated to 29% and 71 % respectively, as you have suggested. The changes are now highlighted in grey.

Please do not hesitate to contact us for any further questions.

Yours sincerely,

[Redacted signature]

Geachte [Redacted],

Op 13 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" met aanvraagnummer AVD1070020171424. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op.
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

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

Met vriendelijke groeten,

[Redacted signature]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: info@zbo-ccd.nl



1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Maastricht University
- 1.3 Provide the title of the project. Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke

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.

Stroke represents currently one of the largest unmet medical needs: It is the second leading cause of death and the first disability worldwide (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>). Almost 2 million people worldwide suffer from stroke every year and more than 1000 drugs have been pre-

clinically tested. However, all attempts to develop an effective drug therapy have failed. Currently, there is only one drug available, a blood-clot dissolving agent (rt-PA) (<http://www.stroke.org/we-can-help/survivors/just-experienced-stroke/stroke-treatments>). However, this drug has over 30 contraindications and bears an extremely high risk of causing fatal bleeding (1). Therefore, 85% of all stroke patients are not treated with it (2). In addition, it is a drug that is only used to take away the cause of the ischemia after it has already happened. There is currently no therapy available to diminish neurological damage to the brain after ischemia.

Therefore, there is a huge need of new therapeutic approaches and redefining drug discovery strategies. The needed innovation would be (i) a drug which is broadly applicable, i.e. has no contraindication, (ii) can be given in all forms of stroke and already in the ambulance, (iii) is safe, i.e. bears no risk to cause secondary bleeding, (iv) is effective and reduces the brain infarct, (v) increases survival and improves neurological outcomes for patients, (vi) and is directly neuroprotective reducing neuronal damage and apoptosis.

Our research addressed the biomedical concept of oxidative stress, i.e. the formation of reactive oxygen species (ROS) which is a fundamental consequence of aerobic life. The dogma was that such ROS are undesirable waste products and even triggers of disease. However, therapies building on so-called anti-oxidants were unsuccessful and even harmful (3). This therapeutic approach could show that the reasons for this were a fundamental misconception of the nature of ROS. In fact, ROS serve essential signaling roles in our body (4-7). Hence, it was to be expected that non-specific scavenging of all ROS with anti-oxidants must have negative consequences. It has been shown that a family of enzymes dedicated to ROS formation, specially NADPH oxidases (NOX) and NO synthase (NOS), is often the main source of ROS and are highly regulated post-ischemia (6, 8). However, we also identify instances where these enzymes become apparently deregulated and can indeed cause disease (9, 10).

By targeting specifically these conditions and only the enzyme subtypes involved with selective drugs together with selectively reversing the damage caused by unwanted ROS, we identified an entirely new approach to the oxidative stress theory and its medical exploitation. We have validated three independent drugs, i.e. NOX and NOS inhibition and sGC activation, that target the same signaling network, but at different positions, and exert a highly synergistic effect in small animal models of stroke, kidney damage or atherosclerosis (*data not published*). Out of the three above possible medical indications for this combination therapy, stroke has the highest unmet need and is therefore chosen for further translation into the clinic. These three drug principles have been validated during the last years in our research group both at the genetic and pharmacological level to be relevant in stroke (**see Figure 1**):

- NADPH oxidase (NOX), an oxygen radical forming enzyme family causing blood-brain barrier breakdown and damage to neurons, which can be prevented by NOX inhibitors (NOXi) (10). There is not enough scientific evidence showing NOX1 as a detrimental enzyme in stroke. Moreover, it has been recently shown that NOX2 seems to play no role in brain ischemia (11),

therefore, NOX inhibition as a therapeutic target will be primarily focus on isoforms 4 and 5. Moreover, it has been described that NOX4 is up-regulated after ischemia (**Figure 2**) what leads to massive ROS production and neuronal damage.

- Nitric Oxide (NO) synthase (NOS), usually a signalling enzyme, which however in stroke is interrupted and instead produces neurotoxic quantities of NO, which can be prevented by NOS inhibitors (NOSi) (9). Similarly to NOX, different NOS isoforms are also up-regulated after ischemia leading to nitrative impairment (**Figure 2**)
- Soluble Guanylate Cyclase (sGC), a protective enzyme, which upon stroke is oxidatively damaged (by both oxygen radicals and NO) to apo-sGC but a drug is available (sGCa), which re-activates this damaged enzyme and thereby is able to reverse or prevent the consequences (*in vivo data unpublished*).



Different representatives of each drug class (NOXi, NOSi, sGCa) were already identified and shown to be highly effective when given alone in different small animal models (9, 10) (**see Figure 3**). Combining the three principles prevents compensatory mechanisms and allows to lower the concentration (or, *in vivo*, dose) of each separate drug. In full combination, our approach, also named network pharmacology, will increase both the efficacy and safety, as the chances for side-effects are reduced by lowering the doses. As a preliminary study, we treated hippocampal brain slices subjected to an ischemic period with sub-threshold concentrations of NOXi, NOSi and sGCa resulting in a clear and significant increase in cell viability (**Figure 4**).



1h 1h 1h 1h 1h 4h 1h 1h



5
10 µg/h

Diasto

Right/Left

Grip test s

g

h

Right/Left ratio

Grip test score

Vehicle

BAY 60

Vehicle

BAY 60

Vehicle

BAY 60

Vehicle

BAY 60



Our therapeutic principle, discovered in the course of the last years (ERC-ADG RadMed) fulfills all above mentioned criteria and is also an innovative approach because we reduce the risk by developing only a single compound by combining three compounds that target the same disease mechanism at different points. We here propose to conduct the final step as a proof of concept (PoC) before a first-in-man study in stroke with the major objective to complete phase III pre-clinical animal trial to provide robust pre-clinical findings for a first-in-man trial in stroke.

References

1. Vandelli L, et al. (2015) Fibrinogen decrease after intravenous thrombolysis in ischemic stroke patients is a risk factor for intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 24(2):394–400.
2. Stankowski JN, Gupta R (2011) Therapeutic targets for neuroprotection in acute ischemic stroke: lost in translation? *Antioxid Redox Signal* 14(10):1841–1851.
3. Schmidt HHHW, et al. (2015) Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxid Redox Signal* 23(14):1130–1143.
4. Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47–95.
5. Kaludercic N, Deshwal S, Di Lisa F (2014) Reactive oxygen species and redox compartmentalization. *Front Physiol* 5:285.
6. Casas AI, et al. (2015) Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications. *Antioxid Redox Signal* 23(14):1171–1185.
7. Ghezzi P, Jaquet V, Marcucci F, Schmidt HHHW (2016) The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. *Br J Pharmacol*. doi:10.1111/bph.13544.
8. Radermacher KA, et al. (2013) Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of

oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 18(12):1418–1427.

9. Kleinschnitz C, et al. (2016) NOS knockout or inhibition but not disrupting PSD-95-NOS interaction protect against ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab*:0271678X16657094.
10. Kleinschnitz C, et al. (2010) Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol* 8(9):e1000479.
11. Kleikers PW, et al. (2015) A combined pre-clinical meta-analysis and randomized confirmatory trial approach to improve data validity for therapeutic target validation. *Sci Rep* 5:13428.
12. Stover JF, et al. (2014) Nitric oxide synthase inhibition with the antipterin VAS203 improves outcome in moderate and severe traumatic brain injury: a placebo-controlled randomized Phase IIa trial (NOSTRA). *J Neurotrauma* 31(19):1599–1606.
13. Pedernera C, Ruiz JL, Castells G, Manteca X, Cristòfol C (2007) HPLC quantification of perphenazine in sheep plasma: application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 854(1-2):308–312.

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?

As previously described, stroke is a public health problem with unmet medical needs which requires to be scientifically addressed. Following target identification and pre-clinical experiments using brain ischemia in vivo models, we have recently identified NOX, NOS and sGC as three promising therapeutic approaches against stroke. Therefore, the major research question is to demonstrate that a combinatory therapeutic approach by targeting different components of the NOX-ROS-cGMP oxidative stress pathway, reduces infarct volume and improves neuro-motor functioning and prognosis.

3.3 Relevance

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

Stroke caused 6.7 million deaths all over the world just in 2012 (WHO report). In the past decades, cerebrovascular diseases have emerged as an epidemic problem which are projected to keep growing in the coming years. Patients of all ages are affected by stroke, from newborn babies to adult patients and the lack of treatment options is also common to all ages. Therefore, there is a huge medical and social need of defining new therapeutic targets and further pharmacological treatments which allow direct improvement in patient outcome. Brain ischemia is a multi-factorial disease composed of several cell mechanisms leading to apoptosis, necrosis, neuronal death and significant tissue damage. Therefore, in stroke, extremely strong neuroprotection agents to maximally reduce brain tissue damage are required. Hence, a multi-factorial disease demands a complex multi-factorial approach which has been developed over the past decades in our group. We present a promising combinatory therapy that could prevent several pathomechanistic changes after stroke.

Therefore, the main purpose of this research project is to take the necessary step of a large animal study

for translating a novel innovative combination therapy for stroke to the clinics.

The end goal of the whole project is to meet a high medical need with an innovative drug combination in patients with stroke for which the animal study will give a proof of principle. The proposed animal study is in line with a long track record of *in vitro* and *in vivo* data which support the concept (**see Figure 2**).

3.4 Research strategy

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

The here proposed experiments are part of a larger continuum that started with *in vitro* models of brain ischemia (rat hippocampal brain slices subjected to oxygen glucose deprivation) and *in vivo* small animal experiments (other PV). We now want to proceed to the next step of a large animal before eventually going for clinical trials. In this PV, a stroke model will be employed in sheep. Drug dosing and administration routes are based on pre-existing pharmacokinetics and pharmacodynamics data in human for NOSi (12), in sheep for NOXi (13) and mouse data for sGCa (confidential company data).

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.

Experiments in this PV will consist of an ovine experimental stroke model.

1. Before starting the surgery, all animals will be subjected to 2-weeks acclimation period. Within these weeks, a 7-day pre-test period will take place to ensure good animal health and provide baseline measurements.
2. To minimize variation with respect to age, 17 sheep at ~ 1 year of age (9 to 21 months) will be employed as an ovine model of transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO). The occlusion of the middle cerebral artery will last for 3.5 to 4 hours and subsequently reperfusion is allowed. This occlusion period usually leads to a profound core infarction, but still leave a considerable penumbra as a primary therapeutic target. Animals are intubated and anaesthetized via tracheal respiration. During surgery all physiological parameters are continuously monitored.
3. Following the ischemia period one group of animals will be injected with the combination of the previously selected drugs (NOXi, NOSi, sGCa). Similarly, a second group of stroke-operated animals will be treated with vehicle solution. A sham group will be used for assessing possible other effects of the treatment.
4. After surgery and treatment injection, animals will be monitored for 1 month including regular assessments of neurological functions, lesion volumetry, cerebral blood flow and metabolic state of brain tissue. In this 4-weeks surveillance period post-treatment, also possible side effects can be detected. However, the latter is highly unlikely as so far no relevant side-effects have been observed, including in the clinic (compounds used for other indications).
5. Finally, at day 28 all animals will be sacrificed and brains will be preserved for further molecular biology analysis.

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.

Previous attempts to translate experimental neuroprotective therapies into clinically applicable therapies have been hampered by the translational roadblock. A particular promising solution to prove a particular

therapeutic concept is to conduct experiments in large animals. Those are not meant to repeat previous rodent work, but to verify obtained results in a gyrencephalic species, which exhibits a body weight and size similar to human patients which allows to use the same equipment and techniques as in humans. Moreover, large animals are feasible for imaging studies using clinical equipment and including sophisticated molecular imaging techniques which could help in pharmacological treatment validation. Next to addressing efficacy endpoints, large animals also provide additional safety information from a third species before ultimately moving forward to phase IIa clinical investigations. Although large animal experiments are significantly more laborious, they help to prepare early stage clinical trials. Thus, we will employ an ovine model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by a combinatory drug therapy which is able to modulate different pathomechanisms directly linked to neuronal damage and poor outcome.

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	Cerebral hypoxia-ischemia
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'.	10700	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Cerebral Hypoxia-Ischemia

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We will use the ovine stroke model to test our combinatory neuroprotective therapy in a large animal species, as necessary step before proceeding to clinical trials. After the surgical procedure, animals will be kept within 4 weeks where infarct size, neurological function, cerebral blood flow and metabolic state will be used as outcome parameters. These parameters are clinically the most relevant to assess the effect of our neuroprotective therapy and can also be directly translated to a possible clinical trial afterwards.

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

We want to perform a stroke model in sheep by a transient occlusion of the middle cerebral artery (MCA). Briefly, the skin between the ear and eye was incised on the left side of the head to expose the branches of the superficial temporal artery and the accompanying vein. After occlusion of these vessels, the origin of the temporalis muscle was incised at the temporalis line and the muscle was carefully elevated from the parietal bone. After exposure of the skull bone surface, a hole is drilled into the parietal plate. On local incision of the dura mater, MCA or its branches are clipped during the ischemia period (3,5h to 4h. Then, the clip is removed after the desired ischemia time. Within 4h of tMCAO, vessel

occlusion will be verified by intraoperative imaging (MRI/PET). During surgery and postoperative imaging, body temperature, blood pressure, heart rate, base excess, blood gas, as well as general anesthetic parameters will be recorded. Pre- and post-surgical antibiotic treatment will be administered.

Behavioral phenotype will be tested in the animals at the times -0.5h (before surgery), + 4h and + 12h after substance application. Already within the adaptation phase, the animals are thoroughly accustomed to dealing with the performing staff (for example, by recording clinical parameters and feeding), which means that necessary hand movements do not have a surprising effect on the animals during the experimental period. The behavior test itself does not cause any physical pain and is performed as gently as possible as well as in a quiet stable area. The burden of the animals by the planned behavioral test can be classified as very low.

Detailed procedure is as follows:

Evaluation	Implementation/Execution
1. Consciousness	Observation of the animal in calm and movement (animal responsiveness, communication with species, feed intake, etc.)
2. Attitude assessment a. Ataxia (uncoordinated movements) b. Torticollis (head skew) c. Overcatting (unphysiological footing on the fetlock joint)	Observation of the body (at rest and in motion) and gait with and without sight
3. Positioning and positioning reactions a. Correction reaction b. Bounce reaction c. Wheelbarrow test	a. Front and hind legs are passively overkilled by the examiner (foot on the fetlock joint) or placed on a stable support. Then, the support is carefully pulled to the side. The time for the correction to the physiological position is evaluated. b. To be carried out with the front and rear legs (one leg each), in which case an extremity is lifted (no contact with the ground). By slow pressure or pull on the shoulder or the pelvis the animal reaches a relative oblique position (maximum 55° angle to the ground). The subsequent physiological correction by hopping with the opposing limb is examined and evaluated. c. Raise the hindquarters by enclosing the flank. Both hind legs do not make contact with the soil. The animal only loads the front legs and is carefully pushed forward. The judgment of the posture of the head and of the step (front legs) and step direction is made.

After the surgery, animals will be monitored for 1 month while these behavioral tests were performed. Finally, at day 28 all animals will be sacrificed and brains will be preserved for further post-study necropsy and molecular biology analysis.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into

account to minimise the number of animals.

We will use a power analysis according to the formula $n = 2 \times s^2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 / D^2$ (L. Sachs, Angewandte Statistik, Springer, 1983, Berlin, Springer Verlag), an α of 0.05 and β of 0.8, a minimal statistically assessable treatment effect (D)=55% at a standard deviation (s)=30%, this implies that, at a power of 80%, the minimum number of animals is $n = 15,7 \times (s)^2 / (D)^2$ per group.

B. The animals

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

Species and origin

Sheep will be used from the breeder who has been supplying the animal facility of the University of Maastricht. Animals from 9 to 21 months of age will be used to minimize variation with respect to age. As previously described, sheep studies are ethically less problematic than non-human primate experiments. Moreover, body weight and size in sheep are similar to human patients which allows to use the same imaging equipment and techniques as in human.

Number of animals to be used

We will also taking into account a drop out of the stroke animals of 10% (mortality or excluded animals): $n = 15,7 \times 0,3^2 / 0,55^2 = 4,67 / 0,9 = 5,18 \sim$ **6 animals/group** and **5 animals/group** non considering drop-out (sham).

A total of 17 animals are foreseen to be used, allocated to 3 groups:

- Sham group ($n=5$)
- Stroke group with combination treatment ($n=6$)
- Stroke group with placebo ($n=6$)

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: Due to the complexity of cerebrovascular disorders, a complete **replacement** of animal experiments is still impossible without sacrificing human patient safety in the field. However, our research consortium has obtained relevant information on the therapeutic paradigm in previous in vitro studies, which were completed by selected and carefully performed in vivo (rodent) trials. Only those questions which necessarily need to be answered in large animal trials will be investigated.

Moreover, the use of sheep has been suggested by the European Medical Agency (EMA) to pharmaceutical companies in order to show in vivo the safety and feasibility of the new drug. It is unacceptable to test directly in humans based on exclusively in vitro data by the standards of EMA and

by good clinical practice.

Reduction: We use expert biomedical sample size calculation methodology for **reduction** of animal numbers to the required minimum. This is enabled by the focus on primary endpoints and derivation of relevant biomedical parameters from previous experiments. Due to large experience with sheep we are able to increase the number of animals that successfully reach the end of their experiments. Due to the expertise and experience of our team we have low numbers of drop-outs, which reduces the numbers of animals in the experimental groups. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. In order to reduce the number of animals, we only use rams; since the female animals are better protected against hypoxia-ischemia it would be more difficult to see an effect of our therapy.

Refinement: For **refinement** our experiments, we rely on almost 1.5 decades of experience in the field, characterized by a continuous refinement of all experimental procedures, invasively or non-invasively, conducted to augment (i) animal welfare, (ii) reproducibility, (iii) external and internal validity, and (iv) translational relevance of the protocol. Experiments will be performed according to STAIR and, wherever possible, to ARRIVE criteria. Animals will be subjected to behavioral phenotyping, serial PET and MR imaging, frequent screening of physiological parameters and a detailed post-study necropsy to gain the maximum information yield possible from an individual experiment. Non-recovery experiments have been also considered, however, from a translational point of view, this approach does not make any sense when only clinically relevant endpoints such as infarct volume, behavior and brain metabolism can be investigated. This is almost impossible in non-recovery studies as (i) lesion development and functional recovery take time in the range of days to two weeks and (ii) observation periods >24h cannot be achieved in anesthetized subjects. Moreover, animals tend to become highly unstable under prolonged anesthesia (>12 hours). Our experiments will be conducted by a highly trained staff that can recognize and prevent discomfort. Moreover, we aim to leave the sheep as much in their natural environment as we can with minimal human contact.

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

Before induction of cerebral hypoxia-ischemia the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water ad libitum. After induction of hypoxia-ischemia the sheep are housed in groups with access to food and water ad libitum.

The sheep will be checked daily for discomfort due to inflammation. Analgesia will be used during the whole procedure to reduce the animals' discomfort. Moreover, analgesia will be also applied to reduce sheep discomfort post-surgery for at least 4 days. Pre- and post-operative antibiotics will be administered, in order to prevent (progression of) (wound) infection.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling).

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

☒ No

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

After returning the animals to the stable, they are socially housed and are monitored clinically until they are completely re-awakened. For the further duration of the experiment, the animals are monitored twice a day, whereby at least once a day the general condition, respiratory rate, heart rate, body temperature and mucosal color are recorded according to the scoresheet.

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.

Adequate analgesia will be applied to reduce sheep discomfort post-surgery for at least 4 days (1).

Ref: J. Henke et al. Expert information: Committee on Anaesthesia of GV-SOLAS. Pain management for laboratory animals. Status: May 2015.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Stroke is a severe disorder and the model procedure itself is demanding to the animal. Weight loss between 5 and 8% can be observed on occasion following very severe MCAO. The functional consequences of stroke are somewhat mitigated by the fact that pyramidal fibers do not cross completely in the ovine brain. Stroke therefore induces hemilateral weakness and slight motoric dysfunction, but does not

leave the animal hemi-plegic or hemi-paralyzed as would be the case in primates including humane.
Wound infection can occur after all surgical manipulation, for which appropriate measures will be taken (antibiotics).
Survival rates of the MCAO procedure in sheep clearly exceed 90% under expert care and animals usually recover from post-surgical stress within 2 to 3 days.

Explain why these effects may emerge.

The neurological symptoms that we describe are inherent to the model used and are a sign of the ischemic damage to the brain.

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

All experiments will be conducted by a team of highly skilled veterinarians and bio-technicians. Trained veterinary assistants and bio-technicians will reinforce the team. The team relies on a sophisticated protocol of pre-, peri- and postsurgical stress and pain management, which has been refined together with experts from Animal Welfare agencies and senior veterinary experts over almost a decade. The protocol (details available upon request) relies on multi-drug treatment and is a fixed element in all sheep MCAO studies conducted by the team.

Moreover, animals will be subject to a 24-hour surveillance by veterinarians and/or trained bio-technicians with bihourly visits and welfare checks during the first two days after surgery. Thereafter, animals will be checked for at least three times a day and twice (until day 7) or once (thereafter) during the night.

All invasive procedures, imaging and animal transportation will be conducted under full anaesthesia/ventilation as well as continuous veterinary surveillance and assessment of vital science and physiological parameters.

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.

Humane endpoints:

- Paralysis
- *Sepsis/ infection not responding to treatment:*
 - o **Local (at the site of operation):** redness, pain, and swelling (with or without pus) with local antiseptics or antibiotics are considered a humane endpoint. No improvement after antiseptics/antibiotics treatment after 10 days of treatment is also considered an endpoint.
 - o **Systemic:** Excessive lethargy, time lying down, weight loss > 15%
 - o **Stroke-related:** unable to eat, convulsions, stupor, inability to move
- *Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)*

Indicate the likely incidence.

Humane endpoints are seen in maximally 10% of the experiments

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').

Intervention	Discomfort (Stroke groups – Placebo/treatment)	Discomfort (Sham group)
tMCAO	2 (Mild)	2 (Mild)
Injection compounds	2 (Mild)	2 (Mild)
Survival after stroke	3 (Moderate)	2 (Mild)
Vital measurements	2 (Mild)	2 (Mild)
Neurological assessment	2 (Mild)	2 (Mild)
MRI	2 (mild)	2 (mild)
PET	2 (mild)	2 (mild)
Sacrificing	2 (Mild)	2 (Mild)
Total discomfort	Moderate	

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The ram will be euthanized since we cannot reuse him since vital organs (i.e. brain) have to be sampled for analysis.

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



Centrale Commissie Dierproeven

11.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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

AVD1070020171424

Bijlagen

1

Datum 12 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 april 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" met aanvraagnummer AVD1070020171424. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Het aantal dieren dat licht ongerief zal ondergaan is verduidelijkt.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 juni 2017 tot en met 1 mei 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 april 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:
12 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020171424

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: Universiteit Maastricht
Adres: Postbus 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 juni 2017 tot en met 1 mei 2022, voor het project "Therapeutic interventions to improve outcomes after stroke" met aanvraagnummer AVD1070020171424, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Professor experimental perinatology. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 april 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 6 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 april 2017, ontvangen op 13 april 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 6 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Cerebral Hypoxia-Ischemia				
	Schapen (Ovis aries) /	17	71% Matig 29% 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 worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Aanvraagnummer:
AVD1070020171424

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:

AVD1070020171424

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:

AVD1070020171424

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.