	Inventaris Wob-verzoek W19-02								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS20172664	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven 1			x					
5	Bijlage dierproeven 2			x					
6	Bijlage dierproeven 3			x					
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Verzoek aanvulling aanvraag 1				x		x		
10	Reactie aanvulling aanvraag 1				x		x		
11	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
12	Verzoek aanvulling aanvraag 2				x		x		
13	Reactie aanvulling aanvraag 2				x		x		
14	Advies CCD				x				x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x	

2 1 AUG 2017

Centrale Commissie Dierproeven

1

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

X Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 50200

☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

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

Naam instelling of organisatie	Biomedical Primate Research Centre
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e
KvK-nummer	41146967

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

Straat en huisnummer	Lange Kleiweg	161
Postbus	3306	
Postcode en plaats	2288 GJ	Rijswijk
IBAN	10.2.g	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting Biomedical Primate Research Centre	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie	10.2.g	
Afdeling		
Telefoonnummer	10.2.e	
E-mailadres		

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

(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie	10.2.g	
Afdeling		
Telefoonnummer	10.2.e	
E-mailadres		

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

2 Over uw aanvraag

2.1	Wat voor aanvraag doet u?	☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
		☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
		☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
2.2	Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
		☐ Nee > Ga verder met vraag 3
2.3	Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	☐ Nee > Ga verder met vraag 3
		☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01 - 12 - 2017
		Einddatum	30 - 11 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	*Plasmodium cynomolgi* als model voor *P. vivax* malaria voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	De ontwikkeling van geneesmiddelen tegen malaria inclusief slapende lever stadia	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	10.2.g
		Postadres	
		E-mailadres	10.2.e

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541 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

X 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

☒ 3 bijlagen beschrijving dierproeven

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	10.2.e 10.2.g
Functie	
Plaats	Rijswijk
Datum	17 - 08 - 2017
Handtekening	10.2.e en 10.2.g

Centrale Commissie Dierproeven

2

Format
Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	Vul de titel van het project in.	*Plasmodium cynomolgi* in resusapen als model voor *P. vivax* malaria in mensen voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

☐ Fundamenteel onderzoek

x Translationeel of toegepast onderzoek

☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie

☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier

☐ 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 Algemene projectbeschrijving

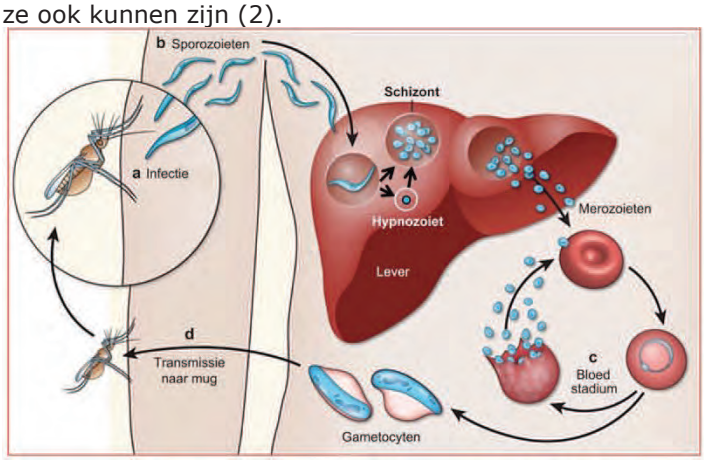
3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Malaria is een van de belangrijkste infectieziekten voor de mens, en treft vooral het armste deel van de wereldbevolking in de (sub)tropen. Malaria is een ernstige ziekte, soms met dodelijke afloop. Het grote aantal ziektegevallen in de betreffende landen heeft een grote negatieve invloed op de sociaal economische ontwikkeling in die landen. Jaarlijks sterven zo'n 500.000 mensen, vooral kinderen jonger dan 5 jaar, aan deze ziekte en 3,2 miljard mensen in 95 landen lopen risico op een malaria besmetting. Een goed werkend vaccin is nog steeds niet beschikbaar en de malaria parasiet wordt in hoog tempo resistent tegen de huidige geneesmiddelen. Onderzoek naar vaccins en nieuwe geneesmiddelen is dan ook zeer urgent om uiteindelijk malaria uit te roeien (1).
Malaria wordt veroorzaakt door Plasmodium parasieten, die door malaria muggen van de soort *Anopheles* worden overgedragen. Na een muggenbeet infecteren de parasieten (sporozoieten genaamd) eerst de lever, waar ze zich in 6-10 dagen vermenigvuldigen (figuur 1). Dit deel van de infectie is zonder symptomen. Als de geïnfecteerde levercel open barst komen er 10.000-40.000 nieuwe parasieten vrij, die rode bloedcellen infecteren en zich cyclisch ~10-voudig vermenigvuldigen. Dit bloedstadium veroorzaakt de ziekte malaria. In het bloed vormen zich ook geslachtelijke cellen die, wanneer opgenomen via een muggenbeet, en na bevruchting in de mug, uiteindelijk weer leiden tot sporozoieten in de speekselklieren van de mug.
Er zijn 5 Plasmodium soorten die ziekte geven in de mens, waarvan *P. falciparum* en *P. vivax* de belangrijkste zijn. De meeste doden worden door *P. falciparum* veroorzaakt, terwijl *P. vivax* ernstige ziekte en soms ook de dood van patiënten veroorzaakt. Plasmodium parasieten hebben een nauw gastheer bereik; er zijn Plasmodium soorten die vogels, reptielen, knaagdieren, apen en mensen van nature infecteren. De meeste apen malarias infecteren ook mensen en sommige zijn een belangrijke zoönose. De twee belangrijkste humane malarias (*P. falciparum* en *P. vivax*) infecteren experimenteel alleen chimpansees (worden niet meer gebruikt als model), *Aotus* en *Saimiri* apen. De parasieten moeten aan deze apen geadapteerd worden en meestal moeten de apen gesplenectomeerd worden om een bloedstadium infectie te kunnen krijgen. Door deze restricties en door de zeer beperkte beschikbaarheid van deze apensoorten voor biomedisch onderzoek worden deze modellen zelden gebruikt, hoe waardevol ze ook kunnen zijn (2).



Figuur 1. De levens cyclus van malaria. Sporozoieten uit de mug infecteren de lever. Hypnozoieten in de lever komen alleen bij *P. vivax*, *P. ovale* (menselijke malarias), en een klein aantal niet-humane primaten malarias voor. Merozoieten vanuit de lever infecteren rode bloedcellen, waarin de parasiet zich cyclisch vermenigvuldigt. Ook vormen zich dan geslachtelijke stadia (gametocyten), die de mug weer infecteren.

P. vivax is 1 van de 2 humane malaria parasieten die in de lever ook slapende stadia (hypnozoieten, zie figuur 1) vormen. Deze kunnen na weken, maanden of jaren reactiveren en weer aanleiding geven tot malaria, zonder dat een nieuwe infectie is opgetreden. Hypnozoieten vormen een grote belemmering voor de toekomstige uitroeiing van de parasiet, vooral omdat na re-activatie geïnfecteerde individuen alweer besmettelijk zijn voor muggen voordat ze malaria symptomen krijgen. Er blijft dus transmissie van mens naar mug (en weer naar mens) plaatsvinden, direct vanuit gereactiveerde hypnozoieten. Veilige nieuwe geneesmiddelen zijn nodig om deze stadia te bestrijden. Op dit moment is alleen primaquine geregistreerd als geneesmiddel tegen hypnozoieten en dat heeft veel bijwerkingen en bovendien lijkt de parasiet resistentie te ontwikkelen (3).

Onderzoek naar *P. vivax* is bijzonder lastig, omdat de bloedstadia van de parasiet niet *in vitro* gekweekt kunnen worden. Er kunnen dus ook geen muggen gevoed worden op *in vitro* kweken voor de productie van sporozoieten, die nodig zijn om onderzoek te doen naar *P. vivax* leverstadia. Voor de *P. vivax* leverstadia zelf is onlangs een chimeer muismodel ontwikkeld, met humane hepatocyten, waarin *P. vivax* leverstadia zich ontwikkelen en waarin zich ook hypnozoieten vormen (4). Voor het screenen van hele grote aantallen geneesmiddelen tegen hypnozoieten is dit *in vivo* model niet geschikt (*in vivo* modellen hebben inherent een veel te lage 'throughput') en ook biologische studies zijn lastig, omdat daarvoor veel sporozoieten van dezelfde parasiet lijn nodig zijn (deze hebben exact dezelfde biologie). De enige bron voor sporozoieten is bloed van geïnfecteerde mensen, en vaak heeft ieder individu weer een iets andere parasiet, wat biologische studies aan dezelfde parasiet bemoeilijkt. Bovendien is, door de zeer beperkte beschikbaarheid van *P. vivax* parasieten, genetische manipulatie technologie van *P. vivax* voor toegepaste biologische studies en zgn. 'target discovery' en -validatie zeer slecht ontwikkeld. Deze technologie heeft bijvoorbeeld bij biologische studies aan *P. falciparum* voor grote doorbraken gezorgd.

Op het instituut waar dit onderzoek uitgevoerd zal worden, wordt het probleem rond geneesmiddelen onderzoek voor *P. vivax* aangepakt door te werken met de apen malaria *P. cynomolgi*. Dit is de zuster parasiet van *P. vivax* met een vrijwel identieke biologie (inclusief vorming van hypnozoieten). *P. cynomolgi* infecteert van nature resusapen en ook mensen en is historisch veel gebruikt in *in vivo* onderzoek naar medicijnen tegen hypnozoieten. De bloedstadia van deze parasiet kunnen, net als bij *P. vivax*, niet *in vitro* gekweekt worden, maar er is een procedure ontwikkeld waarbij met bloed uit een geïnfecteerde resusaap muggen worden gevoed, waaruit dan sporozoieten worden geïsoleerd voor *in vitro* leverstadium onderzoek en drug screening. In de *in vitro* leverstadium kweek worden primaire resusaap hepatocyten gebruikt, die vers geïsoleerd worden uit dieren die geëuthanaseerd worden om veterinaire en/of koloniemanagement redenen en waaruit naast de lever ook andere organen voor *in vitro* studies geïsoleerd worden. Iedere keer wordt dezelfde *P. cynomolgi* stam gebruikt, om genetische en biologische variatie te vermijden. Voor drug screening, dat vroeger geheel *in vivo* uitgevoerd werd in het gouden standaard *P. cynomolgi*-resusaap model (5), is een *in vitro* platform ontwikkeld waarbij de activiteit van potentiële geneesmiddelen op hypnozoieten in *in vitro* drug assays gemeten kan worden. Het toegepaste onderzoek dat in dit kader uitgevoerd wordt bestaat uit een aantal onderdelen:

- Productie van sporozoieten voor leverstadium onderzoek, inclusief de *in vitro* drug assays, waarvoor parasiet donor resusapen gebruikt worden.
- *In vivo* evaluatie van de activiteit van geoptimaliseerde potentiële geneesmiddelen die met de *in vitro* assays zijn geïdentificeerd.
- Dit wordt vaak voorafgegaan door een pharmacokinetiek (PK) studie in al-dan-niet met sporozoieten geïnfecteerde resusapen.
- Tot slot worden *in vivo* parasiet transfectie studies uitgevoerd om merker parasieten te maken om

  i) de *in vitro* drug assays een betere voorspellende waarde voor activiteit tegen echt slapende hypnozoieten te kunnen geven. Dit kan door bijv. merkers te introduceren in de parasiet die aangeven wanneer de hypnozoiet echt 'slaapt' en niet nog in ontwikkeling is; deze gemerkte parasieten zullen dan in drug assays gedood moeten worden door middelen die de potentie hebben om verder ontwikkeld te worden tot geneesmiddel.
  ii) drug targets te identificeren. Dit kan bijv. gebeuren door eerst merker parasieten met behulp van de merker (bijv. een fluorescente merker) in grote hoeveelheden te zuiveren en dan via –omics studies processen in de hypnozoiet te ontdekken die gebruikt kunnen worden om nieuwe geneesmiddelen (maar mogelijk ook vaccins en diagnostica) te ontwikkelen.
  iii) drug targets te valideren, bijv. door gen modificatie- of knock out studies, waarbij de hypnozoiet dood moet gaan als de drug target essentieel is voor het overleven van de parasiet. Voor al deze transfectie studies zijn parasiet donor resusapen nodig om voldoende bloedstadium parasieten te leveren voor de transfecties; Na de transfecties

worden de getransfecteerde bloedstadium parasieten gebruikt om acceptor resusapen te infecteren. Van deze acceptor apen wordt bloed afgenomen met de getransfecteerde parasieten om daarna parasiet stocks te maken voor later gebruik en geïnfecteerd bloed aan muggen te voeren voor sporozoiet productie en verder leverstadium onderzoek.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

De algemene doelstelling van dit project is het screenen van potentieel nieuwe geneesmiddelen op activiteit tegen malaria hypnozoieten, om ze dan verder te kunnen ontwikkelen tot medicijnen. Zoals hierboven beschreven zijn nieuwe geneesmiddelen tegen hypnozoieten hard nodig in de strijd tegen malaria. Dit wordt bereikt door aan de ene kant grote hoeveelheden nieuwe potentiële middelen van diverse chemische samenstelling willekeurig te screenen op *in vitro* hypnozoiet kweken, en aan de andere kant meer te leren over de hypnozoiet biologie, waarmee mogelijke drug targets geïdentificeerd en gevalideerd kunnen worden om dan gericht nieuwe geneesmiddelen te maken tegen die targets. Potentieel nieuwe medicijnen met *in vitro* activiteit tegen hypnozoieten moeten, veelal na een PK studie, *in vivo* gevalideerd worden in het gouden standaard *P. cynomolgi*-resusaap model, voordat ze in klinische studies in mensen getest kunnen worden. Uiteindelijk worden zoveel mogelijk verzamelingen van chemische stoffen getest voor activiteit op de leverstadium parasieten, om zoveel mogelijk 'hits' te krijgen. Hierdoor wordt de kans dat enkele van deze hits ook daadwerkelijk tot medicijn ontwikkeld kunnen worden vergroot (het percentage dat af valt in het ontwikkelingsproces is groter dan 90%). Het uiteindelijke doel is om in de komende 5 jaar tienduizenden chemische en biologische stoffen getest te hebben op activiteit tegen hypnozoieten in steeds verder geoptimaliseerde assays (o.a. door gebruik te maken van nieuwe merker parasieten ontwikkeld binnen dit project). Naar verwachting zullen hieruit, samen met de activiteiten van andere laboratoria, tientallen 'hits' naar voren komen, waarvan een enkele al in het stadium van klinische evaluatie zal zijn. De opgedane kennis van de moleculaire biologie van de parasiet zal zeker een belangrijke bijdrage hebben geleverd aan de interpretatie van de uitkomst van drug assays (hoe werken de gevonden actieve stoffen en doden ze de echt slapende parasieten).
De afgelopen jaren is grote progressie gemaakt met de ontwikkeling van een *in vitro* malaria leverstadium platform voor het screenen van geneesmiddelen (6) en in een *in vivo* transfectie platform voor *P. cynomolgi (7*), waarmee transgene parasieten gemaakt kunnen worden die ook weer in de *in vitro* leverstadium kweken geanalyseerd kunnen worden. Ook is het bestaande *in vivo* model verder geoptimaliseerd (8), zodat betrouwbaar activiteit van nieuwe potentiële middelen preklinisch getest kan worden. Op dit moment is het instituut waar dit onderzoek plaats vindt het enige lab in de wereld dat routinematig malaria hypnozoieten in kweek heeft voor drug screening en toegepaste studies aan de biologie van de hypnozoiet. Met alle opgedane kennis en ervaring is de haalbaarheid van het project zeer groot.
Referenties

1
0
.
2
.
g

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Malaria is één van de belangrijkste infectieziekten, veroorzaakt door 5 verschillende humane malaria parasieten. Deze parasitaire ziekte komt voor in de tropen en subtropen en treft vooral de armste bevolking op aarde. Het grote aantal ziektegevallen zorgt ervoor dat kinderen niet naar school kunnen en volwassenen niet goed kunnen deelnemen aan het arbeidsproces. Dit heeft een desastreuze invloed op de sociaal-economische ontwikkeling van de getroffen landen waar malaria in grote mate voorkomt. Dodelijke slachtoffers, zo'n 500.000 per jaar, zijn vooral kinderen jonger dan 5 jaar in Afrika ten zuiden van de Sahara. Er bestaan nog geen goed werkende vaccins en de malaria parasieten worden in hoog tempo resistent tegen bestaande geneesmiddelen; onderzoek dat leidt tot nieuwe vaccins en geneesmiddelen is dan ook zeer urgent om de ziekte onder controle te houden en uiteindelijk uit te roeien. Buiten Afrika is *Plasmodium vivax* de meest voorkomende malaria parasiet die mensen infecteert. Deze parasiet veroorzaakt niet zo vaak dodelijke slachtoffers, maar heeft door de ernstige ziekte die hij toebrengt, een grote socio-economische impact op de endemische gebieden. *P. vivax* heeft een unieke eigenschap die niet voorkomt bij de humane malaria parasiet die de meeste dodelijke slachtoffers veroorzaakt (*P. falciparum*); hij vormt namelijk slapende parasieten (hypnozoieten) in de lever na een infectie. Deze parasieten vormen een verborgen parasieten reservoir (lever infecties verlopen asymptomatisch) en zijn een ernstige complicatie bij de uiteindelijke uitroeiing van malaria met medicijnen en vaccins. Er is maar 1 geneesmiddel geregistreerd dat hypnozoieten kan doden, primaquine, maar dat middel heeft vele bijwerkingen en parasieten beginnen hier resistent tegen te worden. Het hier beschreven onderzoek is erop gericht om nieuwe, veilige geneesmiddelen te ontwikkelen tegen hypnozoieten, door meer kennis op te doen over de (moleculaire) biologie van de hypnozoiet en door grote hoeveelheden potentiële geneesmiddelen te screenen op de hypnozoiet, en actieve middelen verder te testen op de werking. De opgedane biologische kennis zal mogelijk zwakke plekken in de hypnozoiet bloot leggen, die aangepakt kunnen worden met nieuwe geneesmiddelen. Positieve resultaten uit dit onderzoek zullen leiden tot het terugdringen van het aantal met *P. vivax*-geïnfecteerde mensen, waardoor vivax malaria verder onder controle gebracht kan worden en uiteindelijk hopelijk geëlimineerd.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Het project bestaat uit 3 onderdelen die na elkaar en/of gelijktijdig kunnen plaatsvinden: **Het eerste onderdeel** is op grote schaal screenen van potentieel nieuwe geneesmiddelen op *in vitro* gekweekte *P. cynomolgi* leverstadium parasieten. Dit screenen gebeurt 'random', door gebruik te maken van zogenaamde bibliotheken van kleine chemische en biologische stoffen, die beschikbaar zijn vanuit de farmaceutische industrie. Om leverstadium parasieten te kunnen kweken zijn resusapen nodig als parasiet donor. Bloed van geïnfecteerde donor apen wordt afgenomen en gebruikt om *ex vivo* muggen te voeden, waarna parasieten uit de mug gebruikt worden om de leverstadium kweken te starten voor de screening. **Het tweede onderdeel** is de *in vivo* evaluatie van potentieel nieuwe geneesmiddelen (al dan niet ontdekt in de *in vitro* screening) in *P. cynomolgi*-geïnfecteerde resusapen. Om deze apen met sporozoieten te infecteren is weer een parasiet donor aap nodig uit onderdeel 1. Dit onderdeel kan voorafgegaan worden door een PK studie in al-dan-niet geïnfecteerde resusapen (zie hieronder). **Het derde onderdeel** is validatie/ontdekking van mogelijke drug targets en studies aan de (moleculaire) biologie van hypnozoieten d.m.v. moleculaire analyse van parasieten (transfecties). Hierbij worden ook merker parasieten gemaakt, die d.m.v. de merker te detecteren zijn in bepaalde stadia van ontwikkeling. Dit kan helpen om de drug assay specifieker te maken, bijvoorbeeld als de merker zichtbaar is als hypnozoieten diep in slaap zijn; in de drug assay kan dan gezocht worden naar middelen die specifiek deze gemerkte populatie doden. Ook kunnen merker parasieten gebruikt worden om grote hoeveelheden van een bepaald stadium te zuiveren, bijv. met behulp van cell sorting (FACS) als fluorescente merkers gebruikt worden. Voor transfecties zijn parasiet donor resusapen nodig om voldoende bloedstadium parasieten te verkrijgen; verder zijn acceptor resusapen nodig, waar getransfecteerde parasieten in opgekweekt worden om vervolgens muggen te voeden op het geïnfecteerde bloed, als hierboven beschreven.
Zoals hierboven gezegd, zullen de 3 onderdelen gedurende de 5 jaar gelijktijdig uitgevoerd worden.

Het screenen van grote hoeveelheden verschillende chemische en biologische stoffen gaat continu door. Hieruit zullen 'hits' komen die in de 5 jaar in verschillende stadia van ontwikkeling zullen verkeren en dus ook op verschillende tijden in aanmerking kunnen komen voor *in vivo* evaluatie. De *in vitro* assay zal steeds verder geoptimaliseerd worden door gebruik van nieuw gemaakte merker parasieten, voortkomend uit verschillende moleculaire analyses van hypnozoieten (-omics studies). Nieuwe drug targets die in de 5 jaar worden gevonden zullen met transfectie studies gevalideerd worden.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

In het eerste onderdeel is het type dierproef **malaria infectie van resusapen (bijlage 1)**. Hier worden resusapen geïnfecteerd met bloedstadium *P. cynomolgi* parasieten, die niet *in vitro* gekweekt kunnen worden. Wanneer de parasieten zich voldoende vermenigvuldigd hebben, worden malariamuggen *ex vivo* gevoed op geïnfecteerd bloed, om sporozoieten te verkrijgen voor het leverstadium onderzoek (screenen van potentiële geneesmiddelen), of om andere resusapen te infecteren voor onderdeel 2. In het tweede onderdeel zijn de typen dierproef een **PK/PD studie** (bijlage 2) en een **effectiviteit studie van nieuwe geneesmiddelen in resusapen (bijlage 3)**. De PK/PD studie kan in ongeïnfecteerde- of in met sporozoieten (uit onderdeel 1) -geïnfecteerde resusapen gedaan worden. De keuze hangt af van wat er al bekend is over de te testen stof. Als bijv. uit *in vitro* tests blijkt dat er geen profylactische activiteit is, zal alleen een PK/PD gedaan worden. Als van een andere stof van dezelfde chemische klasse al profylactische data bekend zijn, zal veelal ook alleen een PK/PD studie worden uitgevoerd. In geïnfecteerde dieren wordt de kinetiek van nieuwe potentiële geneesmiddelen bepaald in dieren die daadwerkelijk leverstadium parasieten hebben, wat de natuurlijke situatie van de toekomstige doelgroep het beste nabootst. Belangrijk voordeel is dat alvast een (beperkt) profylactisch effect gemeten wordt tijdens de –gecombineerde- PK/PD/infectie studie, waardoor een aparte profylactische groep in de effectiviteit studie niet meer nodig is. De studie duurt dan wel langer dan een PK/PD studie, omdat het verschijnen van parasieten in het bloed van de apen gedurende langere tijd gevolgd moet worden om iets te kunnen zeggen over de profylactische activiteit. Bij een profylactische dosering wordt het middel kort na de parasiet-infectie gegeven. De activiteit van het middel wordt dus tegen 'jonge' hypnozoieten getest. We weten al dat de hypnozoiet zich nog verder ontwikkelt en in later stadium vaak niet (of minder) gevoelig is voor geneesmiddelen. De dosering die profylactisch werkt hoeft dus niet effectief te zijn in dieren die curatief worden behandeld (effectiviteits studie).

Volgend op de PK/PD studie, waaruit mede de benodigde dosering bepaald wordt, wordt de effectiviteit studie uitgevoerd in met sporozoieten (uit onderdeel 1) -geïnfecteerde resusapen. Na sporozoiet infectie wordt de primaire bloedstadium infectie behandeld met een standaard anti-malaria middel, dat alleen bloedstadia doodt. Tevens wordt een behandeling gegeven met veelal een hogere en lagere dosering van het experimentele geneesmiddel. Daarna wordt gekeken of en wanneer de dieren weer bloedstadium positief worden, als gevolg van hypnozoieten die weer zijn gaan ontwikkelen en een nieuwe bloedstadium infectie veroorzaken (relapse). Werkende nieuwe geneesmiddelen zullen de relapse aanzienlijk vertragen of, beter, voorkomen. Wanneer het middel niet alle lever parasieten (hypnozoiteen) doodt maar wel een deel zien we een verlenging van de tijd tot relapse. Gebruik van 2 doseringen in de effectiviteits studie is in dat geval nuttig om een nauwkeuriger beeld te krijgen van de mate van effectiviteit van het middel, door te kijken of de mate van vertraging tot hernieuwde bloedstadium infectie. Veelal zullen er dus 2 doseringen worden getest, maar dit zal per experiment worden vastgesteld en worden voorgelegd aan de IvD. het derde onderdeel is het type dierproef **malaria infectie van resusapen (bijlage 1)**. Hier worden resusapen geïnfecteerd met bloedstadium *P. cynomolgi* parasieten. Wanneer de parasieten zich voldoende vermenigvuldigd hebben, worden parasieten gezuiverd uit afgenomen bloed van de donor, getransfecteerd en vervolgens gebruikt om een andere resusaap (acceptor) te infecteren. Wanneer de getransfecteerde parasieten zich voldoende vermenigvuldigd hebben, worden parasiet stocks gemaakt voor later gebruik en malariamuggen *ex vivo* gevoed op geïnfecteerd bloed, om sporozoieten te verkrijgen voor verder leverstadium onderzoek. In sommige gevallen worden resusapen geïnfecteerd met transgene parasieten, met als doel transgene sporozoieten te genereren als beschreven in onderdeel 1, voor verdere karakterisering van de transgene parasieten in de *in vitro* leverstadium kweek.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

De verschillende onderdelen vormen een gebruikelijke reeks in de 'drug discovery' pijplijn. Eerst worden grote hoeveelheden chemische (of biologische) stoffen random *in vitro* gescreend om activiteit op malaria hypnozoieten te ontdekken (onderdeel 1), met als doel om zoveel mogelijk 'hits' te vinden. Als moleculen ontdekt (mijlpaal) en geoptimaliseerd zijn, worden de stoffen verder *in vivo* getest. De eerste stap is meestal een PK/PD studie om de *in vivo* activiteit te bepalen (bijlage 2). Deze PK/PD studie kan al direct volgen op een infectie met de malaria parasieten, om zo een eerste indruk te krijgen van de profylactische werking van het geneesmiddel (ook beschreven in bijlage 2). Vervolgens wordt het geneesmiddel getest in een therapeutische setting in een malaria infectie studie (bijlage 3). Als hierin moleculen gevonden worden die therapeutisch effect hebben (mijlpaal), kunnen die gebruikt worden om verder tot geneesmiddel ontwikkeld te worden, waarbij geoptimaliseerde kandidaten mogelijk nogmaals op *in vivo* effectiviteit in apen getest moeten worden alvorens in het veld op mensen te kunnen testen. Onderdeel 3 dient en ondersteunt meerdere doelen in de pijplijn. Ten eerste worden merker parasieten gecreëerd, die de drug assay vergemakkelijken en verbeteren in output. Denk hier bijvoorbeeld aan parasieten die het punt markeren waarop zij daadwerkelijk het slaap stadium bereikt hebben (mijlpaal). Als merkers kunnen fluorescente eiwitten (bijv. GFP-green fluorescent protein) of eiwitten die luminescente veroorzaken (bijv. luciferase) gebruikt worden, die door aanstralen met UV licht (GFP) of door een chemische reactie (luciferase) zichtbaar gemaakt kunnen worden. De dierstudie ter ondersteuning van onderdeel 3 is verder hetzelfde zoals beschreven in bijlage 1. In een drug assay moeten dan vervolgens vooral deze gemerkte parasieten gevolgd worden om vast te stellen dat deze parasieten gedood worden door nieuwe middelen. Daarnaast worden drug targets die in de drug screening naar voren zijn gekomen gevalideerd d.m.v. gen modificatie studies. Hierbij kunnen bijvoorbeeld genen worden uitgeschakeld en als daardoor hypnozoieten niet meer levensvatbaar zijn, is dat een sterke aanwijzing dat zo'n gen van vitaal belang is voor de hypnozoiet, en dus een valide drug target (mijlpaal). Ten slotte worden merker leverstadium parasieten *in vitro* in grote hoeveelheden aangemaakt en veelal gezuiverd om via bijv. transcriptomics/proteomics/metabolomics nieuwe targets op het spoor te komen voor geneesmiddelen ontwikkeling en mogelijk ook voor diagnostiek. Deze targets zullen dan weer gevalideerd moeten worden via drug assays en/of gen modificatie studies en ze kunnen ook leiden tot nieuwe, betere merker parasieten voor de drug screening. De actieve identificatie van drug targets kan weer leiden tot de zgn. target-based screening, waarbij een drug assay ontworpen wordt gebaseerd op de enzymactiviteit van de target. Als dat succesvol is kunnen drug assays voor die target uitgevoerd worden zonder parasieten.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Malaria infectie van resusapen
2	PK/PD studie in resusapen
3	*In vivo* effectiviteit studie in resusapen
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

3

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	De ontwikkeling van geneesmiddelen tegen malaria inclusief slapende lever stadia
1.2 Looptijd van het project	1 december 2017—30 november 2022
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	malaria, geneesmiddelen, hypnozoieten, resusapen

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	☐ Fundamenteel onderzoek
	x Translationeel of toegepast onderzoek
	☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.	☐ 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)	Malaria is één van de belangrijkste infectieziekten. Het grote aantal ziektegevallen veroorzaakt door malaria zorgt ervoor dat kinderen niet naar school kunnen en volwassenen niet goed kunnen deelnemen aan het arbeidsproces. Dit heeft een desastreuze invloed op de sociaal economische ontwikkeling van de getroffen landen waar malaria in grote mate voorkomt. De ziekte veroorzaakt wereldwijd tot 500.000 doden per jaar en vele miljoenen worden ziek. Malaria in mensen wordt veroorzaakt door 5 verschillende parasieten van de soort *Plasmodium*. Er bestaan nog geen goed werkende vaccins en de malaria parasieten worden in hoog tempo resistent tegen

geneesmiddelen; onderzoek dat leidt tot nieuwe vaccins en geneesmiddelen is dan ook noodzakelijk om de ziekte onder controle te houden en uiteindelijk uit te roeien. Buiten Afrika is *Plasmodium vivax* de meest belangrijke malaria parasiet die mensen besmet. *P. vivax* heeft een unieke eigenschap die het deelt met een aantal *Plasmodium* soorten die apen besmetten; deze vormt slapende parasieten (hypnozoieten) in de lever na een besmetting door malaria muggen, die jaren kunnen blijven zitten om dan ineens toch weer malaria te veroorzaken. Deze parasieten vormen een verborgen parasieten voorraad (lever infecties verlopen zonder dat je het merkt) en zijn daarom een bedreiging voor de uiteindelijke uitroeiing van malaria met medicijnen en vaccins. Er is maar 1 geneesmiddel op de markt dat hypnozoieten kan doden, maar dat middel heeft vele bijwerkingen en parasieten beginnen minder gevoelig te worden voor dit middel. Het onderzoek is erop gericht om nieuwe, veilige geneesmiddelen te ontwikkelen tegen hypnozoieten. Dit gebeurt door i) meer kennis op te doen over de biologie van de hypnozoiet en ii) grote hoeveelheden mogelijk nieuwe geneesmiddelen te testen op de hypnozoiet, en actieve middelen verder te testen op de werking. Positieve resultaten uit dit onderzoek zullen leiden tot het terugdringen van het aantal met *P. vivax*-besmette mensen, waardoor vivax malaria verder onder controle gebracht kan worden en uiteindelijk hopelijk uitgeroeid. Dit zal de gezondheidstoestand van mensen in India, Azië en midden- en zuid Amerika zeer ten goede komen.

3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	De verwachting is dat door het testen van heel veel chemische stoffen op hypnozoieten nieuwe middelen gevonden worden die hypnozoieten kunnen doden. Ook zal de nieuw opgedane kennis over de biologie van de hypnozoieten naar verwachting mogelijk zwakke plekken van de parasiet identificeren. Met die kennis kan dan gericht gezocht worden naar middelen die die zwakke plekken aanpakken. Zowel via grootschalig screenen, als via een gerichte aanpak van mogelijk zwakke plekken, zullen nieuwe stoffen ontdekt worden die verder getest en ontwikkeld kunnen worden tot nieuwe geneesmiddelen om met *P. vivax*-besmette mensen te genezen. Dit zijn de eerste stappen op weg naar controle en uiteindelijk uitroeiing van vivax malaria.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Voor de experimenten zullen in een periode van 5 jaar maximaal 248 resusapen nodig zijn, het aantal te gebruiken dieren is kleiner door de toepassing van hergebruik.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Handelingen kunnen stress veroorzaken. Dit wordt zoveel mogelijk beperkt door dieren te trainen voor eenvoudige handelingen. Voor complexere handelingen zullen dieren verdoofd worden om meer stress en pijn te voorkomen. Verder kunnen dieren mogelijk ziek worden door malaria besmetting.

3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Het ongerief is maximaal matig, maar in de meeste gevallen mild (55% van de dieren).
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Op het einde van elk experiment worden de dieren genezen van malaria en na controle kunnen ze dan deel blijven uitmaken van het dierbestand op het instituut en komen in aanmerking voor hergebruik. Dezelfde dieren kunnen meerdere van deze experimenten doorlopen, waardoor het aantal werkelijk in experiment gebruikte dieren lager zal uitvallen.

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.	Het gebruik van een *in vitro* test voor het screenen van chemische/biologische stoffen op activiteit tegen hypnozoieten vervangt het vroeger gebruikte *in vivo* model (*P. cynomolgi* in resusapen) voor screenen en dit heeft geleid tot een zeer grote reductie in het gebruik van proefdieren. Echter, omdat de bloedstadia van malaria parasieten die hypnozoieten vormen niet *in vitro* gekweekt kunnen worden, moeten om aan de benodigde parasieten voor de leverstadium kweken te komen, dieren besmet worden met de malaria parasiet. Verder moeten mogelijke geneesmiddelen die in de leverstadium kweek ontdekt worden eerst getest worden op werking *in vivo*, voordat verdere ontwikkeling plaats kan vinden en de geneesmiddelen op mensen getest kunnen worden. Door het nauwe gastheer bereik van parasieten die hypnozoieten vormen-deze besmetten alleen mensen en apen- is het gebruik van apen in de keten van geneesmiddelen ontwikkeling onvermijdelijk.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Het aantal dieren dat gebruikt wordt in het screeningsproces van mogelijke geneesmiddelen en voor de ontdekking en validering van mogelijke processen in de hypnozoiet die gevoelig zijn voor geneesmiddelen, is gebaseerd op een zo hoog mogelijke doorloop snelheid. Het is uiteindelijk de bedoeling om wereldwijd miljoenen chemische stoffen te testen op activiteit, omdat de verwachting (en ervaring tot nu toe) is dat er maar weinig stoffen zullen zijn die de hypnozoiet echt kunnen doden en ook tot geneesmiddel voor mensen ontwikkeld kunnen worden. Alle experimenten zijn zo gepland dat de resultaten uit 1 experiment meegenomen kunnen worden in een vervolg experiment. Voor het *in vivo* testen van de werking van mogelijke geneesmiddelen wordt gebruik gemaakt van statistische analyses om tot de optimale groepsgrootte te komen. Waar mogelijk worden parasiet donor apen gecombineerd gebruikt voor verschillende experimenten, bijv. een donor aap voor *in vitro* screenen en voor een *in vivo* studie.
4.3	**Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar	Het onderzoek gebeurt in apen, omdat alleen enkele mensen- en apen malaria's hypnozoieten vormen. Door de opgedane ervaring met het

waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	diermodel zijn de protocollen verfijnd om het ongerief zo klein mogelijk te maken. Het ongerief wordt zoveel mogelijk beperkt door dieren te trainen voor eenvoudige handelingen, wat de stress aanzienlijk vermindert. Ook wordt het volgen van de parasitemie in het bloed tot een minimum beperkt, omdat bij benadering bekend is wanneer parasieten in het bloed verwacht kunnen worden. De klinische malaria verschijnselen in apen die besmet zijn zeer gering, omdat de dieren al vroegtijdig genezen worden en de gezondheidstoestand van de dieren nauwkeurig geobserveerd wordt. De opgedane biologische kennis zal aangeven wat mogelijk zwakke plekken zijn in de hypnozoiet, die aangepakt kunnen worden met nieuwe geneesmiddelen.
Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Grotere bloedafnames, infecties en geneesmiddel doseringen via een maagsonde worden uitgevoerd onder verdoving. Het gebruik van getrainde dieren die vrijwillig meewerken aan bepaalde procedures (verdoving, geneesmiddel toediening, afnemen van een druppel bloed) vermindert de stress. Tijdens de infectie worden de dieren geobserveerd. Als ziekteverschijnselen optreden worden de dieren onmiddellijk genezen van malaria.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	
Andere opmerkingen	

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Malaria infectie van resusapen

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Omdat *P. cynomolgi* parasieten niet *in vitro* gekweekt kunnen worden, moet voor iedere stap in het geneesmiddelen ontwikkelingsproces waarbij levende parasieten nodig zijn een resusaap geïnfecteerd worden om aan de benodigde parasieten te komen. In de praktijk worden 2 ontwikkelingsstadia van de parasiet gebruikt voor onderzoek: Dit zijn a) **sporozoieten** die worden verkregen uit muggen die hebben gevoed op met malaria geïnfecteerd apenbloed en b) **bloedstadium parasieten** die direct uit de geïnfecteerde aap worden verkregen.

a) Sporozoiet productie. Sporozoieten worden gebruikt in een aantal verschillende experimenten, te weten:

1. Het *in vitro* screenen van grote hoeveelheden chemische/biologische stoffen om activiteit op slapende leverstadium parasieten (hypnozoieten) te onderzoeken.
2. Het *in vitro* bestuderen van de biologie van leverstadium parasieten en het zuiveren van grote hoeveelheden leverstadium parasieten voor zgn. –omics studies.
3. Het homogeen infecteren van groepen apen met sporozoieten in een geneesmiddelen effectiviteitsstudie (zie bijlage 2/3).
4. Het maken van bloedstadium parasiet stocks. Malaria parasieten die langdurig als bloedstadium worden doorgezet verliezen het vermogen om muggen te infecteren en sporozoieten te maken. Dat wordt voorkomen door verse stocks te gebruiken die gemaakt zijn uit een infectie met sporozoieten.

b) Bloedstadium parasiet productie. Bloedstadium parasieten worden gebruikt voor:

1. Het maken van parasiet stocks (na infectie als onder a-4) voor later gebruik

2. Het opzuiveren van bloedstadium parasieten voor genetische modificatie studies (transfectie).

In alle gevallen wordt als volgt te werk gegaan. Na i.v. injectie (onder sedatie) van bloedstadium parasieten (uit een ingevroren stock of vers afkomstig van een andere geïnfecteerde aap) of van sporozoieten (optie b-1), wordt de ontwikkeling van bloedstadium parasitemie gevolgd door regelmatig bloedsmeertjes te maken van een druppel bloed, verkregen vanuit een prikje met een naald in het bovenbeen. Bij voldoende hoge parasitemie (>0,2% van de rode bloedcellen is geïnfecteerd; in uitzonderlijke gevallen, als blijkt dat de parasitemie niet verder oploopt, kan ook bij een lagere parasitemie gebloed worden) in de juiste ontwikkelingsstadia (primaire uitkomst parameter) wordt bloed afgenomen om *ex vivo* malaria muggen te voeden voor sporozoiet productie of voor het opwerken van bloedstadium parasieten (alle grotere bloedafnames worden gedaan onder sedatie).
Bij transfectie studies (optie b-2) wordt geïnfecteerd bloed afgenomen om de bloedstadium parasieten op te zuiveren om ze daarna te transfecteren. De transfectie constructen bevatten een resistentie merker tegen een chemische stof. De getransfecteerde parasieten worden vervolgens in een ontvanger aap gespoten. De dieren krijgen de chemische stof toegediend om de getransfecteerde parasieten te selecteren; alleen succesvol getransfecteerde parasieten kunnen die behandeling overleven. Als de parasitemie na behandeling hoog genoeg is (zelfde criteria als hierboven genoemd) wordt bloed afgenomen om muggen te voeden voor leverstadium onderzoek en/of stocks te maken. Wanneer de parasitemie laag blijft en geen muggen gevoed kunnen worden, wordt bloed afgenomen om een tweede ontvanger aap te infecteren, waarin de parasieten meestal beter uitgroeien, zodat muggen voedingen kunnen worden uitgevoerd. Bij alle hiervoor beschreven bloedstadium infecties worden de apen aan het eind van het experiment genezen van malaria.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Parasiet infecties gebeuren d.m.v. i.v. injectie onder sedatie. Kleine bloedafnames gebeuren door een naald prik in het bovenbeen. Dieren worden getraind om mee te werken aan deze procedure d.m.v. positive reinforcement training, en beloond met iets lekkers. Grotere bloedafnames gebeuren onder sedatie.
Genezing van bloedstadium malaria gebeurt door i.m. injecties met anti-malaria middelen. Als een aap met sporozoieten geïnfecteerd is, wordt de aap radicaal genezen d.m.v. de huidige standaard behandeling om bloedstadia (i.m. injecties) en leverstadia (orale toediening) te doden. De duur van een infectie is ongeveer 2 weken, totdat de parasitemie hoog genoeg is om geïnfecteerd bloed af te nemen. Bij infectie met getransfecteerde parasieten kan dit oplopen tot 4-5 weken.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

De aantallen dieren die gebruikt worden zijn gebaseerd op het aantal experimenten dat per jaar naar verwachting uitgevoerd wordt waarvoor bloedstadia of sporozoieten nodig zijn. Het aantal apen zal tot het minimum beperkt worden dat nodig is om de proeven uit te voeren. De belangrijkste parameter is daarbij de hoeveelheid levensvatbare parasieten die geoogst kunnen worden per dier. Er worden in deze bijlage geen groepen dieren met elkaar vergeleken en een power analyse is hier niet van toepassing.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Macaca mulatta van Indiase herkomst. Geschat aantal dieren: ca. 173 dieren in totaal in 5 jaar:

a) 90 dieren voor drug screening
b) 48 dieren voor een geschat aantal van 8 transfectie rondes (6 dieren per transfectie ronde)
c) 30 dieren voor productie van wildtype en transgene parasieten voor verder onderzoek
d) 5 dieren als parasiet donor voor *in vivo* drug efficacy evaluatie.

- Het totaal aantal gebruikte dieren in 5 jaar zal waarschijnlijk lager uitvallen, omdat parasiet donoren na 6 maanden hergebruikt kunnen worden in hetzelfde experiment.

a) De resusaap is één van de natuurlijke gastheren van *Plasmodium cynomolgi*, een primaten malaria parasiet waarvan de bloedstadia niet *in vitro* gekweekt kunnen worden, en dus *in vitro* geen sporozoieten gemaakt kunnen worden. *P. cynomolgi* bloedstadia groeien over het algemeen goed in

resusapen van Indiase herkomst en van elke leeftijd en geslacht. Met 90 dieren kunnen maximaal 90 series drug assays in 5 jaar uitgevoerd worden (naar schatting iedere 3 weken een *in vitro* test). Hiermee kunnen we naar schatting 150.000 stoffen in 'medium throughput' screenen.

b) Voor *in vivo* transfecties is 1 parasiet donor aap nodig om voldoende bloedstadia te zuiveren voor transfectie. Met die parasieten kunnen ca. 3 verschillende transfecties uitgevoerd worden, waarvoor 3 ontvanger apen nodig zijn om de transfectanten te kunnen selecteren. We rekenen met nog 2 extra secundaire ontvanger apen, om bijv. parasieten die niet zo goed groeien verder te kunnen propageren in deze ontvangers om dan muggen te kunnen voeden met bloed waarin zich voldoende parasieten bevinden voor transmissie. Met naar schatting 8 transfectie rondes in 5 jaar tijd is er voldoende tijd om alle transfecties uitvoerig te karakteriseren en de resultaten mee te nemen in de volgende ronde.

c) Verder hebben we ca. 6 apen per jaar nodig voor propagatie van succesvolle transfectanten en/of wildtype parasieten voor verdere leverstadium studies, of om bijv. voldoende bloedstadium parasiet stocks te maken voor verder gebruik.

d) We verwachten ca. 5 drug efficacy studies uit te voeren in 5 jaar. Om deze dieren met sporzoieten te kunnen infecteren (bijlage 3), hebben we 5 parasiet donor apen nodig.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ Nee, ga door met vraag D.

x Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1e van de Wet op de Dierproeven. In geval van eerder gebruik in malaria studies, moet een voorafgaande malaria infectie minimaal 6 maanden geleden zijn uitgevoerd, om zo min mogelijk last te hebben van ontwikkelende immuniteit tegen malaria parasieten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

X Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging. Door het beperkte gastheer bereik van *P. cynomolgi* zijn alleen makaak soorten, met name resusapen, te gebruiken voor dit type onderzoek. Er bestaan wel malaria soorten die knaagdieren infecteren, maar die vormen geen hypnozoieten. Deze komen alleen voor bij malaria soorten die mensen en apen infecteren. Voor het screenen van geneesmiddelen hebben is een *in vitro* platform ontwikkeld, maar om aan de benodigde parasieten te komen is steeds een parasiet donor aap nodig, omdat *P. cynomolgi* niet *in vitro* gekweekt kan worden. Het gebruik van een *in vitro* test voor het screenen van chemische/biologische stoffen op activiteit tegen hypnozoieten vervangt het vroeger gebruikte *in vivo* model (*P. cynomolgi* in resusapen) voor screenen en dit heeft geleidt tot een zeer grote reductie in het gebruik van proefdieren.

Vermindering. De parasiet donor apen worden zeer efficiënt gebruikt; er wordt een maximale hoeveelheid muggen gevoed die we in 1 experiment kunnen hanteren (1000-1500). Waar mogelijk, worden donor apen van verschillende experimenten gecombineerd, bijvoorbeeld de donor aap voor de productie van sporozoieten voor *in vitro* drug screening en een *in vivo* effectiviteit studie. Van de transfectie donor apen wordt een maximale hoeveelheid bloed afgenomen (0,7% van het lichaamsgewicht per bloeding en niet meer dan 1% binnen een periode van 4 weken) bij de maximale parasitemie in de donor aap (tussen de 0,7% en 3%, afhankelijk van de aap). Hieruit worden dan de bloedstadiumparasieten gezuiverd, om maximaal 3 transfecties met het parasiet materiaal te doen ($5x10^7$—10^9 parasieten per transfectie,

afhankelijk van de transfectie methode die voor het specifieke experiment nodig is). Het efficiënte gebruik van donor apen vermindert het aantal benodigde donor apen voor transfectie studies. Indien de parasitemie het toelaat in de ontvanger apen na transfectie, zullen we ook al muggen voeden op het bloed van de primaire ontvangers, om al pilot studies op leverstadia van getransfecteerde parasieten uit te kunnen voeren. Dit kan alleen als de parasieten na transfectie voldoende uitgroeien in de primaire ontvanger apen. Als voor bepaalde transfectanten al voldoende informatie verkregen is zal een secundaire ontvanger niet gebruikt worden.
Verfijning. Het bloedstadium parasitemie verloop van *P. cynomolgi* in resusapen is redelijk voorspelbaar, zowel bij bloedstadium als bij sporozoiet infecties. Hierdoor kunnen we het aantal benodigde bovenbeen prikjes om de parasitemie te volgen tot een minimum beperken, in ieder geval voor de wildtype parasiet infecties. Voor de getransfecteerde parasieten is dit minder voorspelbaar, maar daar plannen we bovenbeen prikjes op strategische momenten rond periodes waarop parasieten verwacht worden, om de dieren zo min mogelijk lastig te vallen en toch de parasitemie ontwikkeling zo goed mogelijk te kunnen volgen. Bovendien maken we gebruik van getrainde dieren (positive reinforcement training), die vrijwillig hun bovenbeen aanbieden voor een prikje, waarna ze een beloning ontvangen. Dit vermindert de stress bij de dieren. De muggenvoedingen gebeuren *ex vivo*, zodat de dieren geen last hebben van (veel) muggenbeten. Na infectie worden de dieren dagelijks gescoord op klinische symptomen m.b.v. een klinische scoringslijst.
Milieu effecten. *P. cynomolgi* is een klasse 2 organisme en experimenten met deze parasiet gebeuren onder inperkingsniveau 2. De productie van transgene parasieten is door de COGEM ingeschaald op inperkingsniveau 2 (DMII en MLII). Geïnfecteerde muggen worden gehanteerd in een speciaal ingericht muggen laboratorium, waarbij de werk protocollen toegespitst zijn op het voorkomen van ontsnappen van malariamuggen. Voor zover bekend zijn er in Nederland geen muggen populaties die transmissie kunnen veroorzaken van *P. cynomolgi*.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De malaria infectie zelf geeft (bij hogere parasitemieën) milde malaria verschijnselen, zoals een koorts piek , verminderde eetlust en verminderde activiteit wanneer de parasieten periodiek uit de geïnfecteerde rode bloedcellen barsten (iedere 48 uur). Dierverzorgers controleren de dieren dagelijks en waarschuwen de onderzoeker indien nodig. De parasitemie is zelf-beperkend, maar wordt goed in de gaten gehouden en de infectie wordt acuut genezen indien de boven beschreven ziekte verschijnselen verergeren en/of langer dan een halve dag aanhouden. Het gebruik van getrainde dieren, als boven beschreven, vermindert de stress (en mogelijk angst) bij de dieren tijdens de handelingen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Niet van toepassing; dit is geen wettelijk vereist onderzoek.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

x Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

x Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

X Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Ongerief door het bijkomen uit de sedatie
Milde malaria symptomen kunnen optreden. Dit zijn koortspieken als boven beschreven, al dan niet vergezeld van gebrek aan eetlust en/of verminderde activiteit. Dit treedt alleen op bij hogere parasitemieën en gedurende een korte periode wanneer parasieten uit geïnfecteerde rode bloed cellen barsten.
Bij behandeling met chloroquine kan bij sommige apen een korte periode van verminderde activiteit en eetlust optreden. Primaquine geeft geen bijwerkingen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Bijkomen uit de sedatie kan desoriëntatie en misselijkheid veroorzaken
Wanneer de parasieten tijdens de vermenigvuldiging uit de rode bloedcellen barsten, om vervolgens nieuwe rode bloedcellen te infecteren, komen toxische stoffen vrij in het bloed die leiden tot deze verschijnselen.
Milde ziekte verschijnselen zijn een bijwerking van chloroquine.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

De dieren worden 16 uur voor sedatie nuchter gehouden, om te voorkomen dat de dieren gaan overgeven bij het ontwaken uit de sedatie.
In het algemeen worden deze verschijnselen nauwelijks waargenomen bij *P. cynomolgi* infecties. Indien ze onverwacht toch in hevige mate optreden wordt onmiddellijk de parasitemie bepaald en indien deze uitzonderlijk hoog zou zijn (>5%) wordt het dier direct genezen met chloroquine injecties. Zeer milde verschijnselen verdwijnen vanzelf weer na enkele uren, als het uitbarsten van parasieten voorbij is.
De bijwerkingen van chloroquine behandeling gaan na enkele uren vanzelf voorbij.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane

eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Als een dier onverwachts ernstig ziek wordt met een extreem hoge parasitemie die niet meer op tijd behandeld kan worden, geldt dit als humaan eindpunt.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<1%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van *'terminaal', 'licht', 'matig'* of *'ernstig'* ongerief.

Licht ongerief voor parasiet donoren (ca 80% van de dieren); matig ongerief, indien veel bovenbeen prikjes gegeven moeten worden of de malaria ziekte verschijnselen onverwacht hoog zijn (ca. 20% van de dieren, vnl. in transfectie studies).

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

X Nee

☐ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☐ Ja

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 2 Type dierproef: PK/PD studie in resusapen

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

In dit experiment, waarbij de primaire uitkomstparameter de pharmacokinetiek/pharmacodynamiek (PK/PD) van de te testen stof is, worden geïnfecteerde of ongeïnfecteerde dieren gebruikt in een PK/PD studie. Infectie vindt plaats door middel van i.v. injectie van *P. cynomolgi* sporozoieten, verkregen uit geïnfecteerde muggen. Vervolgens wordt een standaard PK/PD studie uitgevoerd met een te testen potentieel geneesmiddel tegen leverstadium parasieten. Het voordeel om geïnfecteerde dieren te gebruiken is dat mogelijk de PK/PD beïnvloedt kan worden door infectie in de lever en hierdoor andere resultaten verkregen zouden kunnen worden dan in ongeïnfecteerde dieren. Bovendien kan op deze manier gelijktijdig met het verzamelen van PK/PD data de profylactische activiteit van het nieuwe middel bekeken worden. De keuze om al dan niet geïnfecteerde dieren te gebruiken wordt mede bepaald door wat al bekend is van de werking van de nieuwe stof, bijvoorbeeld uit andere diermodellen. Tijdens de PK/PD studie wordt het nieuwe middel toegediend in een hoeveelheid en frequentie die afhangt van de eigenschappen van het middel. Primaire uitkomst is de concentratie van het middel in relatie tot het toediening schema, waaruit de meest effectieve dosering bepaald kan worden. Een tweede uitkomst, als geïnfecteerde dieren gebruikt worden, is het verschijnen van bloedstadium parasitemie. Als het middel in de gebruikte dosering effectief is en alle leverstadium parasieten (inclusief de parasieten die slapende vormen zouden gaan worden) heeft gedood, zullen de dieren geen bloedstadium parasitemie ontwikkelen. Dit wordt gemonitord door geregeld na infectie een druppel bloed af te nemen middels een bovenbeen prik, waarin de parasitemie bepaald wordt. Als ca. 100 dagen na infectie en behandeling nog geen parasieten aanwezig zijn, is het dier volledig genezen en is het middel profylactisch actief. Indien wel parasieten gevonden worden, worden de dieren radicaal genezen d.m.v. de huidige standaard behandeling om bloedstadia (i.m. injecties) en leverstadia (orale toediening) te doden. Wanneer in de toekomst betere geneesmiddelen (minder bijwerkingen; minder aantal dosering) beschikbaar komen, met name om slapende leverstadia te doden, zullen deze worden gebruikt. De dieren blijven leven na beëindiging van de studie.

Uit de PK/PD studie kunnen ook eventuele bijwerkingen van het kandidaat geneesmiddel aan het licht komen. De eventuele bijwerkingen van het kandidaat geneesmiddel worden bepaald door de dieren dagelijks te monitoren (uiterlijke kenmerken, eetlust etc.) en door andere klinische parameters te bepalen (indien nodig bijvoorbeeld Her/Ser metingen). Afhankelijk van de mate van toxiciteit van het middel zal in overleg met de veterinaire staf worden bepaald of het verantwoord is om dit middel verder te testen op effectiviteit (bijlage 3) of dat er eventuele aanpassingen gedaan moeten worden aan het schema van dosering (frequentie, hoeveelheid). Mocht uit de PK/PD studie blijken dat het middel ook van invloed is op bepaalde klinische parameters van de dieren dan zal hierop vanzelfsprekend goed worden gemonitord in de effectiviteitsstudie.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Parasiet infecties gebeuren d.m.v. i.v. injectie onder sedatie. Veelal zal het te testen middel oraal toegediend worden (via gavage onder sedatie), 1 x per dag gedurende 1-5 achtereenvolgende dagen. Na de toediening zullen kleine bloedmonsters (ca 1 ml) worden afgenomen (onder sedatie) op regelmatige tijden (tot ca. maximaal 8 afnames/24 uur, op 1-3 dagen van toediening), waarin de concentratie van het te testen middel bepaald wordt. Bij herhaaldelijke toedieningen/bloedingen waarbij de dieren gesedeerd worden, zal ook 1x per dag extra voedsel worden toegediend via gavage, na toediening van het te testen middel.
Kleine bloedafnames gebeuren door een naald prik in het bovenbeen (ca. 45x in 100 dagen tijd). Dieren worden getraind voor meewerken aan deze procedure d.m.v. positive reinforcement training, en beloond met iets lekkers. Genezing van malaria gebeurt door i.m. injecties met een anti-malaria middel dat bloedstadia doodt en een ander middel (oraal gedoseerd, na training van de dieren om uit een spuit te drinken) om alle hypnozoieten te doden. Een PK/PD studie in geïnfecteerde dieren duurt maximaal 100 dagen, in ongeïnfecteerde dieren is dat minder dan een week.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voor een PK/PD studie worden veelal 3 dieren gebruikt, omdat de PK/PD tussen de dieren niet veel verschilt en 3 dieren voldoende is om een juiste inschatting van de dosis te maken. De dieren uit de PK/PD studie lijken wat biometrische kenmerken betreft veel op de dieren die in de effectiviteitsstudie gebruikt worden. De spreiding tussen dieren wat betreft tijd tot primaire parasitemie is in onze ervaring zeer gering: alle dieren zijn binnen 2-4 dagen na elkaar positief. De secundaire uitkomst is het verschijnen, of niet, van bloedstadium parasieten, indien de PK/PD wordt uitgevoerd in geïnfecteerde dieren.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Resusapen (*Macaca mulatta)*, volwassen, mannen en vrouwen . Dit is één van de natuurlijke gastheren van *Plasmodium cynomolgi*, een primaten malaria parasiet waarvan de bloedstadia niet *in vitro* gekweekt kunnen worden. *P. cynomolgi* bloedstadia groeien over het algemeen goed in resusapen van Indiase herkomst en van elke leeftijd. Deze dieren worden gebruikt in de geneesmiddelen effectiviteit studie (bijlage 3) en ook in de voorafgaande PK/PD studie. Per PK/PD studie zullen 3 dieren gebruikt worden, en met ca. 1 effectiviteit/PK/PD studie per jaar, zijn dat ca. 15 dieren in een periode van 5 jaar.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ Nee, ga door met vraag D.

x Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1e van de Wet op de Dierproeven. In geval van eerder gebruik in malaria studies en er gewerkt wordt met geïnfecteerde dieren in de PK/PD studie, moet een voorafgaande malaria infectie minimaal 6 maanden geleden zijn uitgevoerd, om zo min mogelijk last te hebben van ontwikkelende immuniteit tegen malaria

parasieten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

x Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging. Indien met geïnfecteerde apen gewerkt wordt: Door het beperkte gastheer bereik van *P. cynomolgi* zijn alleen makaak soorten, met name resusapen, te gebruiken voor dit type onderzoek. Er bestaan wel malaria soorten die knaagdieren infecteren, maar die vormen geen hypnozoieten. Deze komen alleen voor bij malaria soorten die mensen en apen infecteren. Voor de PK/PD studie worden resusapen gebruikt omdat het metabolisme veel lijkt op dat van de mens, en de effectiviteitsstudie ook in resusapen plaats vindt (bijlage 3). Indien mogelijk zullen *in vivo* PK studies vervangen worden door zgn. *in silico* PBPK studies (physiologically based pharmacokinetic modeling), waarbij wiskundige modellen de absorptie, distributie, metabolisme en excretie van stoffen in mensen en dieren proberen te voorspellen.
Vermindering. Met 3 dieren kan een goede dosisbepaling uitgevoerd worden. Als er 1 uitbijter is, kan nog steeds die bepaling plaatsvinden; met 2 dieren zou dat niet meer kunnen. Als met geïnfecteerde dieren gewerkt wordt is een profylactische studie tijdens de effectiviteitsstudie niet meer nodig.
Verfijning. In overleg met de ontwikkelaar van de geneesmiddelen worden minimale hoeveelheden bloed op zo min mogelijk tijdstippen afgenomen, waarbij toch tot een goede PK/PD analyse gekomen kan worden. Omdat we bij geïnfecteerde dieren in grote lijnen weten wanneer we parasieten in het bloed kunnen verwachten, kunnen we de timing van de bovenbeen prikjes daarop afstemmen, waardoor in totaal minder dij prikjes nodig zijn, terwijl we toch de parasitemie ontwikkeling goed vast kunnen leggen. De dieren zijn getraind voor het meewerken aan bovenbeen prikjes. Voor de orale toediening van primaquine worden de dieren ook getraind voor het vrijwillig drinken uit een spuit. Om de bittere smaak van primaquine enigszins te maskeren, wordt een zoete siroop gebruikt.
Milieu effecten. *P. cynomolgi* is een klasse 2 organisme en experimenten met deze parasiet gebeuren onder inperkingsniveau 2 (DMII en MLII).

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De malaria infectie zelf geeft (bij hogere parasitemieën) milde malaria verschijnselen, zoals een koorts piek en verminderde eetlust wanneer de parasieten periodiek uit de geïnfecteerde rode bloedcellen barsten (iedere 48 uur). Dierverzorgers controleren de dieren dagelijks op deze tekenen van malaria en waarschuwen de onderzoeker indien nodig. Zo gauw dieren in de PK/PD studie in geïnfecteerde dieren bloedstadium positief worden, worden ze genezen, omdat dan het eindpunt van dit deel van de studie bereikt is (parasitemie kan pas optreden vanaf dag 8, dus ruim na het einde van de PK monstername). Het gebruik van getrainde dieren, als boven beschreven, vermindert de stress bij de dieren tijdens de handelingen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Niet van toepassing; dit is geen wettelijk vereist onderzoek.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

x Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

x Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

x Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Tijdens de PK studie: Misselijkheid en desorientatie als gevolg van het bijkomen uit herhaald sederen van de dieren voor regelmatige bloedafnames. Bij geïnfecteerde dieren: mogelijk milde malaria symptomen (koorts, slecht eten)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Bijkomen uit sedatie kan gevoel van misselijkheid en desorientatie geven. Wanneer de parasieten tijdens de vermenigvuldiging uit de rode bloedcellen barsten, om vervolgens nieuwe rode bloedcellen te infecteren, komen toxische stoffen vrij in het bloed die leiden tot deze verschijnselen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Dieren worden nuchter gehouden voor sedatie. In het algemeen worden malaria verschijnselen nauwelijks waargenomen bij *P. cynomolgi* infecties en zeker hier worden ze niet verwacht omdat dieren al bij hele lage parasitemie behandeld worden. Indien ze onverwacht toch in hevige mate optreden wordt onmiddellijk de parasitemie bepaald en indien deze uitzonderlijk hoog is wordt het dier direct genezen met i.m. chloroquine

injecties. Zeer milde verschijnselen verdwijnen vanzelf weer na enkele uren, als het uitbarsten van parasieten voorbij is. Bij frequente sedatie worden oraal extra voedingsstoffen toegediend aan de dieren.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Als een dier onverwachts ernstig ziek wordt met een extreem hoge parasitemie die niet meer op tijd behandeld kan worden, geldt dit als humaan eindpunt.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<1%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van *'terminaal', 'licht', 'matig'* of *'ernstig'* ongerief.

Matig ten gevolge van herhaaldelijk sederen in korte tijd.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

x Nee

☐ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☐ Ja

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 3 Type dierproef: *In vivo* effectiviteitsstudie in resusapen

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Na infectie met parasieten uit de mug (sporozoieten) ontwikkelt de malaria parasiet zich verder in de lever en na 1-2 weken komt de parasiet in het bloed en veroorzaakt ziekte. Bij de apen malaria *P. cynomolgi,* een model voor de mensenmalaria *P. vivax,* blijft net als bij *P.vivax,* echter een deel van de leverparasieten in slapende vorm aanwezig in de lever (hypnozoiet) om na activatie een nieuwe infectie golf aan bloed stadium parasieten te veroorzaken. Wij hebben een *in vitro* kweeksysteem opgezet om nieuwe antimalariamiddelen te testen op activiteit tegen deze hypnzoieten. Wanneer uit deze screening nieuwe potentiële geneesmiddelen naar voren komen, moeten deze, na optimalisatie, *in vivo* getest worden om zeker te zijn dat ze *in vivo* werkzaam zijn tegen slapende leverstadium parasieten. Dit gebeurt in het gouden standaard model: met *P. cynomolgi* sporozoieten-geïnfecteerde resusapen. Indien succesvol kunnen de middelen verder ontwikkeld worden voor testen in patiënten, die met *P. vivax* geïnfecteerd zijn. In de *in vivo* effectiviteitsstudie zullen 3 groepen dieren geïnfecteerd worden met *P. cynomolgi* sporozoieten, zoals beschreven in bijlage 1. Na infectie worden alle dieren rond dag 10 bloedstadium positief; dit wordt gemonitord door regelmatig bloedsmeertjes te maken van een druppel bloed verkregen vanuit een prikje met een naald in het bovenbeen, en deze te controleren op bloedstadium parasieten. Wanneer alle dieren positief zijn, worden bij de positieve controle groep de bloedstadium parasieten gedood met een anti-malaria middel dat niet de slapende leverstadium parasieten doodt. Eén of meerdere andere groepen worden, naast behandeling met chloroquine, ook behandeld met verschillende doses van het experimentele middel. Het aantal groepen verschilt per experiment. Hoeveelheid teststof en aantal doses wordt mede bepaald door de uitkomst van een PK/PD studie, als beschreven in bijlage 2. Veelal zal deze behandeling gebeuren d.m.v. orale toediening via een sonde onder verdoving. Tijdens de dosering kan in sommige gevallen op enkele tijdstippen bloed afgenomen worden voor aanvullende PK/PD. Een dag na de behandeling wordt gekeken of alle bloedstadium parasieten inderdaad verdwenen zijn, en daarna worden de dieren regelmatig d.m.v. prikjes in het bovenbeen gemonitord op de terugkeer van bloedstadium parasieten

(relapse), doordat (overlevende) hypnozoieten geactiveerd zijn. Tijd tot relapse is de primaire uitkomst parameter. Als de experimenteel behandelde dieren 100 dagen na behandeling nog parasiet-vrij zijn, worden ze beschouwd als volledig genezen. Een lange vertraging in de tijd tot relapse is een aanwijzing voor activiteit van het experimentele middel, maar kennelijk niet genoeg activiteit om de dieren volledig te genezen bij de gegeven dosering. In zulke gevallen kan ook de tijd tot de tweede relapse gemeten worden, die in de controle groep ca. 3 weken na de eerste relapse optreedt. De eerste relapse wordt dan weer behandeld met chloroquine als boven beschreven. Aan het eind van het experiment worden alle dieren die een relapse gehad hebben radicaal genezen d.m.v. de huidige standaard behandeling om bloedstadia (i.m. injecties) en leverstadia (orale toediening) te doden. De dieren blijven leven na beëindiging van het experiment.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Parasiet infecties gebeuren onder sedatie d.m.v. i.v. injectie. Veelal zal het te testen middel oraal toegediend worden (via gavage onder sedatie), ca. 1 x per dag gedurende 1-5 achtereenvolgende dagen. Bij herhaaldelijke toedieningen waarbij de dieren gesedeerd worden, zal ook 1x per dag extra voedsel worden toegediend via gavage, na toediening van het te testen middel. Kleine bloedafnames gebeuren door een naald prik in het bovenbeen (ca. 45x in 120 dagen tijd). Kleine bloedingen voor aanvullende PK gebeuren onder ketamine sedatie (i.m. injectie; max 5x verspreid over doseringsdagen). Dieren worden getraind voor meewerken aan deze procedure d.m.v. positive reinforcement training, en beloond met iets lekkers. Genezing van bloedstadium malaria gebeurt door behandeling via i.m. injecties met een standaard anti-malaria middel, waarna gewacht wordt tot een relapse (2 a 3x per experiment). Radicale genezing aan het eind van het experiment gebeurt door i.m. injecties met een anti-malaria middel dat bloedstadia doodt en een ander middel (oraal gedoseerd, na training van de dieren om uit een spuit te drinken) om alle hypnozoieten te doden. Het totale infectie en behandelingsexperiment duurt maximaal 120 dagen.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Er worden power calculaties gebruikt om het aantal dieren te berekenen. Deze powercalculaties zijn gebaseerd op infectie data verkregen uit voorgaande experimenten, waaruit de tijd tot relapse (zowel eerste als tweede relapse) als functie van de hoeveelheid ingespoten sporozoieten bekend is. De berekening gebeurt met een 2x2 contingency tabel, met relapse data van 15 controle dieren. Hieruit volgt dat met 4 dieren per groep met een power van 80% een delay van 7 dagen tot relapse gemeten kan worden.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Resusapen (*Macaca mulatta)*, volwassen mannen en vrouwen, ca. 12 dieren (3 groepen van 4 dieren) in 1 effectiviteitsstudie (ca. 60 dieren in totaal in 5 jaar, bij 5 effectiviteitsstudies). Dit is één van de natuurlijke gastheren van *Plasmodium cynomolgi*, een primaten malaria parasiet waarvan de bloedstadia niet *in vitro* gekweekt kunnen worden, en dus *in vitro* geen sporozoieten gemaakt kunnen worden. *P. cynomolgi* bloedstadia groeien over het algemeen goed in resusapen van Indiase herkomst en van elke leeftijd en geslacht. Met ca. 1 experiment (12 dieren) per jaar kunnen in 5 jaar tijd voldoende potentiële geneesmiddelen geëvalueerd worden, die met *in vitro* screenings programma's ontdekt zijn, om tot klinische kandidaten te komen.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ Nee, ga door met vraag D.

x Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1e van de Wet op de Dierproeven. In geval van eerder gebruik in malaria studies, moet een voorafgaande malaria infectie minimaal 6 maanden geleden zijn uitgevoerd, om zo min mogelijk last te

hebben van ontwikkelende immuniteit tegen malaria parasieten.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

x Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging. Door het beperkte gastheer bereik van *P. cynomolgi* zijn alleen makaak soorten, met name resusapen, te gebruiken voor dit type onderzoek. Er bestaan wel malaria soorten die knaagdieren infecteren, maar die vormen geen hypnozoieten. Deze komen alleen voor bij malaria soorten die mensen en apen infecteren. Voor het op grote schaal testen van vele stoffen hebben we een *in vitro* platform ontwikkeld; stoffen die hieruit naar voren komen en geoptimaliseerd zijn moeten eerst in het diermodel getest worden op *in vivo* activiteit, voordat met klinische trials kan worden begonnen.
Vermindering. Met een powercalculatie zoals hierboven beschreven wordt het minimale aantal dieren per groep bepaald dat nodig is om tot significante uitkomsten te komen.
Verfijning. We maken gebruik van getrainde dieren die vrijwillig hun bovenbeen aanbieden voor een prikje met een naald om een druppel bloed af te nemen (positive reinforcement training). Daarna krijgen ze een beloning. Deze procedure vermindert de stress bij de dieren voor dit soort procedures. Omdat we in grote lijnen weten wanneer we parasieten in het bloed kunnen verwachten, kunnen we de timing van de prikjes daarop afstemmen, waardoor in totaal minder prikjes nodig zijn, terwijl we toch de parasitemie ontwikkeling goed vast kunnen leggen. Voor de orale toediening van primaquine worden de dieren getraind voor het vrijwillig drinken uit een spuit. Om de bittere smaak van primaquine enigszins te maskeren, wordt een zoete siroop gebruikt.
Milieu effecten. *P. cynomolgi* is een klasse 2 organisme en experimenten met deze parasiet gebeuren onder inperkingsniveau 2 (DMII en MLII).

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De malaria infectie zelf geeft (bij hogere parasitemieën) milde malaria verschijnselen, zoals een koorts piek, lusteloosheid en verminderde eetlust wanneer de parasieten periodiek uit de geïnfecteerde rode bloedcellen barsten (iedere 48 uur). Dierverzorgers controleren de dieren dagelijks op deze symptomen en waarschuwen de onderzoeker indien nodig. De parasitemie is zelf-beperkend, maar wordt goed in de gaten gehouden en de infectie wordt acuut genezen wanneer parasieten in het bloed worden waargenomen. Het gebruik van getrainde dieren, als boven beschreven, vermindert de stress (en mogelijk angst) bij de dieren tijdens de handelingen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Niet van toepassing; dit is geen wettelijk vereist onderzoek.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

x Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

x Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

x Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Milde malaria symptomen kunnen optreden. Dit zijn koortspieken als boven beschreven, al dan niet vergezeld gebrek aan eetlust en lusteloosheid. Dit treedt alleen op bij hogere parasitemieën en gedurende een korte periode wanneer parasieten uit geïnfecteerde rode bloed cellen barsten. Bij de lage parasitemieën in dit experiment (<0.5%) zullen de symptomen zeer mild zijn. Verder kan stress optreden door herhaaldelijk prikjes in het bovenbeen te geven, gedurende langere tijd.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Wanneer de parasieten tijdens de vermenigvuldiging uit de rode bloedcellen barsten, om vervolgens nieuwe rode bloedcellen te infecteren, komen toxische stoffen vrij in het bloed die leiden tot deze verschijnselen.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

In het algemeen worden deze verschijnselen nauwelijks waargenomen bij lage *P. cynomolgi* bloedstadium infecties. Indien ze onverwacht toch in hevige mate optreden wordt onmiddellijk de parasitemie bepaald en indien deze uitzonderlijk hoog is wordt het dier direct genezen met i.m. chloroquine injecties. Zeer milde verschijnselen verdwijnen vanzelf weer na enkele uren, als het uitbarsten van parasieten voorbij is. Verder wordt stress tegengegaan door gebruik te maken van getrainde dieren, die vrijwillig prikjes in het bovenbeen toelaten, waarna ze beloond worden.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane

eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Als een dier onverwachts ernstig ziek wordt met een extreem hoge parasitemie die niet meer op tijd behandeld kan worden, geldt dit als humaan eindpunt.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<1%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van *'terminaal', 'licht', 'matig'* of *'ernstig'* ongerief.

Matig, door herhaaldelijk verdoven tijdens de dosering en door vele dij prikjes die genomen worden in de loop van de studie.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

x Nee

☐ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☐ Ja

7

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD5020020172664

2. Titel van het project: *Plasmodium cynomolgi* in resus apen als model voor *P. vivax* malaria in mensen voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia.

3. Titel van de NTS: De ontwikkeling van geneesmiddelen tegen malaria inclusief slapende lever stadia.

4. Type aanvraag:
   - ✓ nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC: 10.2.g
   - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e
   - e-mailadres contactpersoon: 10.2.e

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ✓ ontvangen door DEC: 24-07-2017
   - ✓ aanvraag compleet: 24-07-2017
   - ✓ in vergadering besproken: 02-08-2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - ✓ termijnonderbreking(en) van 08-08-2017 tot 11-08-2017
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ✓ aanpassing aanvraag: 11-08-2017
   - ✓ advies aan CCD: 17-08-2017

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
   De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend bij de DEC.

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

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

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
   - Datum
   - Plaats
   - Aantal aanwezige DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager
   - Gestelde vraag / vragen
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum: 08-07-2017
   - Gestelde vraag/vragen: Enige tekstuele aanpassingen, aanvullende informatie betreffende de onderlinge samenhang tussen de studie onderdelen en de mogelijkheid tot parallelle uitvoering, het uitvoeren van PK studies in geïnfecteerde dieren en de mogelijkheid om physiologically based pharmacokinetic modelling toe te passen, aanvullende informatie over milieueffecten, hergebruik en humane eindpunten.
   - Datum antwoord: 11-08-2017
   - Verstrekt(e) antwoord(en): Het project is aangepast in de NTS (3.6 hergebruik binnen dit project), het projectvoorstel (3.4.1 en 3.4.2 samenhang studie onderdelen, parallelle uitvoering en uitleg over uitvoeren PK studies in geïnfecteerde dieren. Physiologically based pharmacokinetic modelling is opgenomen in bijlage 2.
   - De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC). N.v.t.
    - Aard expertise
    - Deskundigheid expert
    - Datum verzoek
    - Strekking van het verzoek
    - Datum expert advies
    - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen onderzoek naar parasitaire pathogenen, statistische analyse, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming. De DEC heeft ruime ervaring met het beoordelen van de modellen die gebruikt worden voor screenen en evalueren van nieuwe geneesmiddelen tegen malaria in niet-humane primaten.

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. Een van de DEC leden is betrokken bij de aanvraag. Deze persoon heeft zich teruggetrokken van de vergadering bij de bespreking van de aanvraag en heeft geen aandeel gehad in de afweging en advisering.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het voorgestelde onderzoek bestaat uit drie onderdelen, te weten 1) het op grote schaal *in vitro* screenen van potentieel nieuwe geneesmiddelen, 2) *in vivo* evaluatie van potentieel nieuwe geneesmiddelen en 3) ontwikkelen van genetisch gemodificeerde parasieten. De genetisch gemodificeerde parasieten zullen of een "merker" gen krijgen, waardoor ze beter te detecteren zijn, of een verandering ondergaan in een gen dat een mogelijke drug target is. Deze genetisch gemodificeerde parasieten zullen bijdragen aan de selectie van effectieve geneesmiddelen tegen malaria, enerzijds door inzicht te verschaffen in de werkingswijze en eigenschappen van het geneesmiddel en anderzijds door verbetering van de screenings methode (onderdeel 1). De subdoelen sluiten logisch aan bij het hoofddoel en vormen een samenhangend geheel en zijn noodzakelijk om het hoofddoel te bereiken. Screening van nieuwe geneesmiddelen onder 1) leidt tot evaluatie van effectiviteit *in vivo* (2) en bepaling van de betrokken moleculaire pathways door experimenten met genetische gemodificeerde parasieten leidt tot verdere ontwikkeling en verbetering van het geneesmiddel. Het verwachte ongerief voor de dieren is duidelijk omschreven en de uitkomsten van deze experimenten zijn helder en meetbaar. Het aantal dierproeven is realistisch ingeschat en voor zover mogelijk statistisch onderbouwd. De klinische eindpunten zijn duidelijk gedefinieerd.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorie, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek', sluit aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag worden nieuwe kandidaat geneesmiddelen tegen malaria eerst *in vitro* en daarna *in vivo* onderzocht op hun effectiviteit tegen malariaparasieten. Met de hier gebruikte *in vitro* methode kunnen naar schatting 150.000 nieuwe kandidaat geneesmiddelen getest worden in een periode van 5 jaar. Voor het verkrijgen van parasieten voor deze *in vitro* studies zijn op gezette tijden proefdieren nodig. Door verdere *in vivo* evaluatie van een zeer beperkt aantal meest belovende geneesmiddelen wordt belangrijke informatie verkregen voor verdere klinische ontwikkeling.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Het directe doel van het project is het screenen van nieuwe kandidaat geneesmiddelen op activiteit tegen de slapende stadia (hypnozoieten) van de malaria parasiet. Buiten Afrika is deze vorm van malaria het meest voorkomend en veroorzaakt ernstige ziekte en heeft een grote socio-economische impact. Momenteel is er maar 1 geneesmiddel beschikbaar tegen deze vorm van malaria en dit middel heeft vele bijwerkingen en er treedt parasitaire resistentie op. Het uiteindelijke doel is het vinden van effectieve behandelingen tegen deze vorm van malaria. De onderzoekers gebruiken een uniek *in vitro* systeem dat het mogelijk maakt om grote aantallen kandidaat geneesmiddelen te screenen op werkzaamheid tegen hypnozoieten. Daarnaast zal door aanvullende *in vivo* experimenten worden vastgesteld of en in hoeverre de geselecteerde kandidaat geneesmiddelen in aanmerking komen voor verdere klinische evaluatie. Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de

belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld).* De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een effectief geneesmiddel tegen die vormen van malaria waarbij slapende stadia in de lever optreden zijn de te genezen personen, de proefdieren en het onderzoeksveld.

Voor de te genezen personen is het beschikbaar komen van een effectief middel tegen malaria van groot belang, aangezien er momenteel maar 1 medicijn is tegen deze specifieke vorm van malaria waarbij slapende stadia in de lever optreden en de parasiet resistent aan het worden is tegen dit medicijn. Zonder effectieve medicijnen is de infectie blijvend en zullen regelmatig nieuwe ziekte periodes optreden. Dit heeft een ernstig nadelig effect op het welzijn en functioneren van de geïnfecteerde persoon. Alleen met het beschikbaar komen van nieuwe geneesmiddelen kan deze vorm van malaria bestreden worden.
Het belang voor de samenleving is dat met malaria geïnfecteerde personen genezen worden. Hierdoor wordt ook de verdere verspreiding, door muggen, onder de menselijke populatie voorkomen. Dit resulteert in; een sterke verbetering van de gezondheid van grote groepen mensen, een sterke beperking van de uitgaven voor verpleging en medicatie en minder verlies in economische productiviteit.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen stress ondervinden, in lichte mate ziek worden en soms enige mate van pijn ondervinden.

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s). Dit onderzoek kan leiden tot ontwikkeling van geheel nieuwe klassen van anti-malaria geneesmiddelen en in meer inzicht in de werkingsmechanismen van deze geneesmiddelen en de fysiologie van de malaria parasiet, waardoor verdere ontwikkeling van deze middelen gestimuleerd wordt.

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

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn boven iedere twijfel verheven gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. Het gebruikte *in vitro* model voor screening van kandidaat geneesmiddelen tegen malaria is uniek en leidend binnen dit onderzoeksveld. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project. Er komen veel kandidaat-geneesmiddelen beschikbaar om verder te screenen *in vitro* en, indien de uitkomsten dit rechtvaardigen, ook op hun werkzaamheid *in vivo*. Of binnen de projectduur kandidaten beschikbaar komen die verdergaan naar klinisch onderzoek is niet met zekerheid te zeggen, maar de ontwikkeling van malaria geneesmiddelen die ook hypnozoieten aanpakken is afhankelijk van deze vorm van onderzoek.

Welzijn dieren

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

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

   De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met plasmodium soorten die gekenmerkt worden door aanwezig zijn van slapende leverstadia, en die een grote gelijkenis vertonen met dergelijke plasmodium soorten bij de mens. Deze apen parasieten kunnen zelf ook in beperkte mate in de mens voorkomen. De kandidaat geneesmiddelen worden in eerste instantie getest in een *in vitro* model, waarvoor echter bloed van een geïnfecteerd dier nodig is. Daarnaast zal door *in vivo* experimenten worden vastgesteld of en in hoeverre de geselecteerde kandidaat geneesmiddelen in aanmerking komen voor verdere klinische evaluatie. De resultaten verkregen in dit proefdiermodel kunnen in belangrijke mate een beschermend effect tegen deze vorm van malaria in de mens voorspellen. Eventueel waargenomen bijwerkingen zijn eveneens relevant voor de mens.
   Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Ook gebruik in een eerdere malaria studie vormt, na een rustperiode van 6 maanden, geen belemmering voor hergebruik. Het werkelijke aantal dieren die binnen dit project gebruikt gaan worden zal daardoor lager uitvallen. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.
    De huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief is op basis van ervaring met malaria infectie studies en PK studies in niet-humane primaten correct als licht ingeschat voor het merendeel van de studies waarbij malaria infectie van resusapen plaats vindt voor sporozoiet en bloedstadium parasiet productie (bijlage 1) en matig voor de PK/PD en *in vivo* effectiviteits studies (bijlage 2 en 3). Het ongerief wordt veroorzaakt door de experimentele technieken, de toegediende geneesmiddelen en de klinische symptomen ten gevolge van de infectie. Monitoren van klinische symptomen en veelvuldig meten van de parasitemie wordt gebruikt om tijdig in te grijpen en de dieren te genezen voordat ernstige ziekteverschijnselen optreden. De dieren zijn speciaal voor dit doel gefokt, en zullen als sociaal compatibel duo worden gehuisvest.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de dieren te infecteren met malaria en door de toediening van geneesmiddelen tegen malaria. Deze aantasting is van voorbijgaande aard, de dieren keren naderhand terug naar hun oorspronkelijke toestand, qua gezondheid en welzijn.

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 zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de kans dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken terecht als zeer laag ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. In dit project wordt een *in vitro* model gebruikt voor de screening van een zeer groot aantal kandidaat geneesmiddelen tegen malaria. Echter de sporozoieten die nodig zijn in dit *in vitro* model kunnen alleen verkregen worden door muggen te infecteren met parasieten die aanwezig zijn in bloed van geïnfecteerde dieren. Ook bij deze infectie wordt een *in vitro* techniek gebruikt waardoor voorkomen wordt dat de apen door de muggen gestoken moeten worden. De malaria parasiet zelf is echter nog niet *in vitro* te kweken. Daarom blijven geïnfecteerde dieren nodig. Alleen de meest geschikte kandidaten geneesmiddelen worden vervolgens *in vivo* getest. Of een kandidaat geneesmiddel werkzaam is tegen hypnozoieten kan alleen getest worden in makaken, aangezien malaria parasieten die deze vorm van malaria veroorzaken en bovendien sterk lijken op de bij de mens voorkomende parasiet alleen in makaken voor komen. Door de experimenten in niet-humane primaten kunnen inzichten in effectiviteit en mogelijke bijwerkingen naar voren komen die bij onderzoek met andere diersoorten gemist zouden zijn. Deze stap over te slaan en direct onderzoek met menselijke vrijwilligers te verrichten is in dit stadium van de ontwikkeling de kandidaat geneesmiddelen dan ook niet verantwoord.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe. Het ontwikkelde model om stadia van de malaria parasiet, m.n. hypnozoieten, *in vitro* te kweken maakt het mogelijk om grote aantallen kandidaat geneesmiddelen te screenen op mogelijke werkzaamheid. Met deze strategie wordt het zoeken naar behandelingen voor malaria beter mogelijk en tevens het gebruik van proefdieren voor drug screening geminimaliseerd. Het aantal dieren dat nodig is voor de drug screening en de transfecties is nauwkeurig beschreven en tot een minimum beperkt. Ook voor de PK studies wordt alleen het strikt noodzakelijk aantal dieren gebruikt. Het aantal benodigde dieren voor de *in vivo* evaluatie (bijlage 3) wordt bepaald met behulp van statische powerberekeningen op basis van de verwachte tijd tot relapse en op basis van een 2x2 contingency tabel. Bij het onderzoeken van meerdere kandidaten geneesmiddelen binnen een proefopzet zal het aantal controlegroepen beperkt worden. Er wordt opgemerkt dat het aantal gebruikte dieren geringer is dan het aantal dierproeven door het toepassen van hergebruik.

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 uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren die goed aan mensen gewend zijn, de dieren zijn bovendien getraind om zo veel mogelijk mee te werken aan bepaalde dier technische handelingen, waardoor ze minder stress ervaren. Sedatie wordt toegepast wanneer geïndiceerd. Bij onverwacht grotere welzijnsaantasting dan voorzien zal een humaan eindpunt worden toegepast. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

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

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. Hergebruik is mogelijk, ook binnen dit project (mits er na infectie een tussenperiode van 6 maanden in acht wordt genomen). Hergebruik zal plaats vinden binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke criteria ten aanzien van de dierproef.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het testen van nieuwe kandidaat geneesmiddelen tegen malaria het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen.

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

   De waarden voor de samenleving zijn gelegen in het ontwikkelen van medicijnen die het mogelijk maken om personen te genezen die met malaria soorten besmet zijn die slapende stadia in de lever ontwikkelen. Momenteel is er maar 1 medicijn beschikbaar tegen deze vorm van malaria en dat heeft veel bijwerkingen en de parasiet wordt er resistent tegen. Vele miljoenen mensen lijden aan

deze vorm van malaria en dit heeft een grote impact op welzijn en op economische productiviteit. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn van de samenleving (minder zieken, minder doden).

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze kunnen in lichte mate ziek worden door infectie met malaria en enige pijn ondervinden door bloedafnames en injecties. De dieren ondervinden hiervan licht tot matig ongerief.

De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de moleculaire pathways binnen de parasiet die belangrijk zijn als aangrijpingspunt voor nieuwe medicijnen tegen malaria. Deze inzichten kunnen leiden tot verdere ontwikkeling en verbetering van nieuwe klassen anti-malaria middelen.

Indien door dit onderzoek nieuwe werkzame stoffen gevonden worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van medicijnen die mensen kunnen genezen van malaria infectie en die een alternatief kunnen vormen voor het huidige middel, waar de parasieten resistent tegen worden. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

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

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

Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat het ontwikkelen van effectieve medicijnen met malaria geïnfecteerde mensen kan genezen. Daarnaast kan dit onderzoek meer inzicht geven in de moleculaire pathways die door deze medicijnen worden aangegrepen, hetgeen de verdere ontwikkeling van nog betere medicijnen zal bevorderen.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door het feit dat de gebruikte onderzoekmodellen voor een groot deel door de onderzoeker zelf zijn opgezet en gebruikt voor screening van nieuwe kandidaat medicijnen tegen malaria. De onderzoeker en het instituut bezitten de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor het verkrijgen van de benodigde malaria parasieten, al dan niet genetisch gemodificeerd, en voor het *in vivo* testen van de effectiviteit van kandidaat medicijnen, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met sterk op de humane malaria parasiet gelijkende parasieten die vergelijkbare slapende stadia in de lever geven. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. De dieren zullen in leven blijven aan het einde van het project.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. De te gebruiken modellen voor *in vitro* en in vivo screening zijn deels binnen dit instituut opgezet en reeds eerder toegepast. Deze modellen maken het mogelijk om naar schatting 150.000 nieuwe kandidaat geneesmiddelen te testen. Uiteindelijk dienen de meest veelbelovende kandidaten *in vivo* op therapeutische werking getest te worden voordat overgegaan kan worden op klinisch onderzoek. Dit onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in de resusaap, aangezien alleen deze diersoort

gevoelig is voor deze voor de mens relevante vormen van malaria en modelleert voor 'slapende vormen' van de parasiet, de hypnozoieten. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoort, de dieren zijn afkomstig uit eigen fok, de 3V-principes worden gehonoreerd door toepassing van ontwikkelde *in vitro* modellen, hergebruik van dieren, en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen (positive reinforcement). Het ongerief is maximaal matig maar kan ook vaak tot licht beperkt blijven. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
   - ✓ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
     - ✓ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
     - ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
     - ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
     - ☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:…
     - ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:…
     - ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:…

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus. De belanghebbende die lid is van de DEC heeft geen aandeel gehad in de totstandkoming van dit advies.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.

Centrale Commissie Dierproeven

8

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020172664

Bijlagen
1

Datum 18 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte Dr. Langermans,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 augustus 2017. Het gaat om uw project "Plasrnoclium cynomolgi als model voor P. vivax malarla voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020172664. 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.

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,

Datum:
18 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172664

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier

Datum:
18 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172664

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	50200
Naam instelling of organisatie:	Biomedical Primate Research Centre
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	10.2.e
KvK-nummer:	41146967
Straat en huisnummer:	Lange Kleiweg 161
Postbus:	3306
Postcode en plaats:	2288 Gi RIJSWIJK
IBAN:	10.2.g
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Stichting Biomedical Primate Research Centre

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
18 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172664

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

Naam:	10.2.e
Postbus:	3306
Postcode en plaats:	2288 GJ RIJSWIJK
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?	Ja
Wat mag de gemachtigde doen?	[ ] Een projectvergunning aanvragen [ ] Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen [ ] Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning [ ] Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift [x] Alle bovenstaande opties

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

Datum:
18 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172664

Over uw project

Geplande startdatum:	1 december 2017
Geplande einddatum:	30 november 2022
Titel project:	Plasrnoclium cynomolgi als model voor P. vivax malarla voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia
Titel niet-technische samenvatting:	De ontwikkeling van geneesmiddelen tegen malarla inclusief slapende lever stadia
Naam DEC:	10.2.g
Postadres DEC:	10.2.g
E-mailadres DEC:	10.2.e

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.541,-
De leges voldoet u:	via eenmalige incasso

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:	10.2.e
Functie:	10.2.g
Plaats:	Rijswijk
Datum:	17 augustus 2017

10

10.2.e

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 13 september 2017 10:27
Aan: 10.2.e
Onderwerp: AVD5020020172664: aanhouden beoordelen

Geachte 10.2.e

Op 17 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD5020020172664. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

- U geeft aan random te gaan screenen met als doel zoveel mogelijk targets te vinden. U bent van plan ca 150.000 stoffen te screenen. Hiervoor zijn 90 dieren nodig. Uit de overige bijlagen maken wij op dat de opbrengst van deze methode vrij laag is, u verwacht maar 5 kandidaten in vivo te kunnen gaan testen. U wordt, in het kader van vermindering, verzocht toe te lichten waarom een meer gerichte approach niet mogelijk is en of het mogelijk is keuzemomenten in te bouwen tijdens de screening.

- U geeft aan dat dieren van Indiase afkomst gebruikt worden. Voor de volledigheid wordt u verzocht aan te geven waar de dieren gekocht worden of dat deze zelf gefokt worden.

- U geeft aan dat het benodigd aantal dieren in bijlage 3.4.4.1 uiteindelijk lager zal uitvallen, omdat dieren hergebruikt kunnen worden. Het is onduidelijk hoeveel dieren naar verwachting hergebruikt kunnen worden en of het aantal dieren niet op voorhand naar beneden bijgesteld kan worden. U wordt verzocht dit toe te lichten.

-De NTS is te lang. Een NTS mag maar uit circa 500 woorden bestaan. U wordt verzocht deze in te korten.

Opsturen binnen veertien dagen
De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 14 september. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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).

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 18 augustus 2017 11:30
10.2.e
Onderwerp: OntvangstBevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD5020020172664

Geachte 10.2.e

Vriendelijk verwijs ik u naar de brief en de bijlagen.

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Namens:
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl
.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Antwoorden op vragen aanvraagnummer AVD5020020172664

1. *U geeft aan random te gaan screenen met als doel zoveel mogelijk targets te vinden. U bent van plan ca 150.000 stoffen te screenen. Hiervoor zijn 90 dieren nodig. Uit de overige bijlagen maken wij op dat de opbrengst van deze methode vrij laag is, u verwacht maar 5 kandidaten in vivo te kunnen gaan testen. U wordt, in het kader van vermindering, verzocht toe te lichten waarom een meer gerichte approach niet mogelijk is en of het mogelijk is keuzemomenten in te bouwen tijdens de screening.*

Wij verwachten inderdaad dat de random screening maar een beperkt aantal 'hits' zal opleveren. Dit is gebaseerd op de ervaring van random screenen sinds de jaren 50 van de vorige eeuw, waarbij in vivo gescreend werd, en onze huidige ervaring met –beperkt- in vitro screenen. Tezamen heeft dit screenen slechts 8-aminoquinolines opgeleverd als actieve moleculen, waarvan Primaquine al lange tijd het enige klinisch gebruikte geneesmiddel is en Tafenoquine op dit moment in fase 3 klinische trials getest wordt. Wereldwijd zijn naar schatting nog maar een paar duizend stoffen getest, in vivo of in vitro, en de verwachting is dat screenen met een hogere throughput tot meer succes zal leiden, omdat veel meer verschillende chemische structuren getest kunnen worden. Overigens zullen niet alle 'hits' tot bruikbare stoffen leiden die tot medicijnen ontwikkeld kunnen worden en de bruikbare 'hits' zullen worden geprioriteerd voor het in vivo testen. Wij verwachten alleen de beste 5 te kunnen testen in de komende 5 jaar.
Er zitten zeker keuzemomenten in het screeningsproces. Als bijvoorbeeld tijdens de screening blijkt dat een bepaalde klasse van kinase inhibitors goede activiteit vertonen, zullen chemische stoffen die op die kinases werken een speerpunt vormen in de screening om zo snel mogelijk tot een optimale stof te komen die in vivo getest kan worden. Overigens, omdat de succes rate van hit naar geneesmiddel kleiner is dan 10%, moeten zoveel mogelijk hits gevonden worden, ook met verschillende manier van werking om resistentie ontwikkeling tegen de nieuwe middelen te kunnen ondervangen.
Een meer gerichte aanpak wordt ook gevolgd, zoals beschreven in de aanvraag. Een deel van het onderzoek is er namelijk op gericht om via transcriptomics en proteomics nieuwe drug targets te identificeren. Met deze targets kunnen dan in vitro (enzym)assays ontwikkeld worden om specifieke verzamelingen van chemische stoffen te testen. Eventuele 'hits' uit dit soort assays zullen dan formeel nog in de in vitro parasiet assay getest moeten worden, om te laten zien dat stoffen die de werking van bepaalde enzymen die in de parasiet tot expressie komen verhinderen, ook de parasiet in de levercel kunnen doden. Deze aanpak geeft samen met de random screening aanpak de grootste kans om zoveel mogelijk 'hits' te vinden.

2. *U geeft aan dat dieren van Indiase afkomst gebruikt worden. Voor de volledigheid wordt u verzocht aan te geven waar de dieren gekocht worden of dat deze zelf gefokt worden.*

De dieren die gebruikt worden in de aangegeven studies komen uit de eigen fok.

3. *U geeft aan dat het benodigd aantal dieren in bijlage 3.4.4.1 uiteindelijk lager zal uitvallen, omdat dieren hergebruikt kunnen worden. Het is onduidelijk hoeveel dieren naar verwachting hergebruikt kunnen worden en of het aantal dieren niet op voorhand naar beneden bijgesteld kan worden. U wordt verzocht dit toe te lichten.*

Een aantal dieren, met name de parasiet donor apen, kan hergebruikt worden omdat de apen een aantal bloedstadium infecties kunnen doormaken (ca 2-3) voordat ze zo immuun worden dat infectie niet meer mogelijk is. Het is op dit moment niet te zeggen hoeveel dieren voor hergebruik in aanmerking komen, omdat dat afhangt van de voorgeschiedenis van iedere individuele aap en of een individuele aap niet geselecteerd wordt voor een ander experiment.

4. *De NTS is te lang. Een NTS mag maar uit circa 500 woorden bestaan. U wordt verzocht deze in te korten.*

Een nieuwe, kortere NTS is bijgevoegd

10.2.e

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 19 september 2017 15:17
Aan: 10.2.e
Onderwerp: RE: AVD5020020172664: aanhouden beoordelen

12

Geachte 10.2.e ,

Wij hebben uw antwoord ontvangen. Wij zouden u willen verzoeken om in aanvulling op de beschreven criteria gedurende het screeningproces ook de criteria te benoemen op basis waarvan mogelijke targets in vivo getest worden. Kunt u daarnaast aangeven of er ook nog een safety test wordt uitgevoerd voordat de drug targets in vivo gevalideerd worden.

Opsturen binnen veertien dagen
De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 27 september. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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).

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 13 september 2017 10:27
Aan: 10.2.e
10.2.e
Onderwerp: AVD5020020172664: aanhouden beoordelen

Geachte

Op 17 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD5020020172664. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

- U geeft aan random te gaan screenen met als doel zoveel mogelijk targets te vinden. U bent van plan ca 150.000 stoffen te screenen. Hiervoor zijn 90 dieren nodig. Uit de overige bijlagen maken wij op dat de opbrengst van deze methode vrij laag is, u verwacht maar 5 kandidaten in vivo te kunnen gaan testen. U wordt, in het kader van vermindering, verzocht toe te lichten waarom een meer gerichte approach niet mogelijk is en of het mogelijk is keuzemomenten in te bouwen tijdens de screening.

- U geeft aan dat dieren van Indiase afkomst gebruikt worden. Voor de volledigheid wordt u verzocht aan te geven waar de dieren gekocht worden of dat deze zelf gefokt worden.

- U geeft aan dat het benodigd aantal dieren in bijlage 3.4.4.1 uiteindelijk lager zal uitvallen, omdat dieren hergebruikt kunnen worden. Het is onduidelijk hoeveel dieren naar verwachting hergebruikt kunnen worden en of het aantal dieren niet op voorhand naar beneden bijgesteld kan worden. U wordt verzocht dit toe te lichten.

-De NTS is te lang. Een NTS mag maar uit circa 500 woorden bestaan. U wordt verzocht deze in te korten.

Opsturen binnen veertien dagen
De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 14 september. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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).

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 18 augustus 2017 11:30
Aan: 10.2.e
CC: 10.2.e
Onderwerp: OntvangstBevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD5020020172664

Geachte 10.2.e

Vriendelijk verwijs ik u naar de brief en de bijlagen.

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Namens:
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl
.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Antwoorden op aanvullende vraag aanvraagnummer AVD5020020172664

1. *Wij hebben uw antwoord ontvangen. Wij zouden u willen verzoeken om in aanvulling op de beschreven criteria gedurende het screeningproces ook de criteria te benoemen op basis waarvan mogelijke targets in vivo getest worden. Kunt u daarnaast aangeven of er ook nog een safety test wordt uitgevoerd voordat de drug targets in vivo gevalideerd worden.*

Wij ontwikkelen zelf geen geneesmiddelen, maar werken samen met geneesmiddelontwikkelaars. Als in de in vitro assay een 'hit' gevonden wordt, volgt veelal een proces van chemisch optimaliseren van de hit, om betere eigenschappen te verkrijgen. Dit zijn bijvoorbeeld een verhoogde activiteit tegen de parasiet en een verlaagde activiteit tegen de gastheer (de zogenaamde 'therapeutic window'), een betere wateroplosbaarheid, verbeterde PK, verbeterde stabiliteit, etc. Als deze verbeteringen bereikt zijn is pas de fase van preklinisch testen op activiteit bereikt in het in vivo model. Tijdens dit hele proces, dat voor iedere 'hit' anders verloopt omdat het afhankelijk is van de chemische structuur en eigenschappen van de 'hit', zullen stoffen afvallen omdat ze niet genoeg te verbeteren zijn. De meest optimale stoffen die overblijven zullen geprioriteerd worden voor in vivo testen, waarbij bovenstaande criteria belangrijk zijn, met name de 'therapeutic window'. Voordat een stof in vivo getest wordt op activiteit, heeft tijdens het optimalisatie proces ook al een scala aan in vitro en in vivo (vaak in knaagdieren) safety studies plaatsgevonden, zodat zeer aannemelijk is dat de te gebruiken dosis niet schadelijk is voor de dieren.

Centrale Commissie Dierproeven

14

Datum 07-09-2017
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20172664

Advies aan CCD

B

Instelling:	Biomedical Primate Research Centre
Onderzoeker:	10.2.e
Project:	Plasmodium cynomolgi als model voor P. vivax malaria voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia
Aanvraagnummer:	AVD20172664
Betreft:	Nieuwe aanvraag
Categoriën:	Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	11.1

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1. Malaria infectie van resusapen				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		173	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**
3.4.4.2. PK/PD studie in resusapen				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		15	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**
3.4.4.3. In vivo effectiviteitsstudie in resusapen				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		60	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**

In dit project worden non humane primaten gebruikt.
CITAAT.

P. vivax is 1 van de 2 humane malaria parasieten die in de lever ook slapende stadia (hypnozoieten) vormen. Deze kunnen na weken, maanden of jaren reactiveren en weer aanleiding geven tot malaria, zonder dat een nieuwe infectie is opgetreden. Hypnozoieten vormen een grote belemmering voor de toekomstige uitroeiing van de parasiet, vooral omdat na re-activatie geïnfecteerde individuen alweer besmettelijk zijn voor muggen voordat ze malaria symptomen krijgen. Er blijft dus transmissie van mens naar mug (en weer naar mens) plaatsvinden, direct vanuit gereactiveerde hypnozoieten. Veilige nieuwe geneesmiddelen zijn nodig om deze stadia te bestrijden.

Door het beperkte gastheer bereik van P. cynomolgi zijn alleen makaak soorten, met name resusapen, te gebruiken voor dit type onderzoek. Er bestaan wel malaria soorten die knaagdieren infecteren, maar die vormen geen hypnozoieten. Deze komen alleen voor bij malaria soorten die mensen en apen infecteren.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1. Malaria infectie van resusapen / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.
- 3.4.4.2. PK/PD studie in resusapen / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.
- 3.4.4.3. In vivo effectiviteitsstudie in resusapen / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	10.2.g [redacted]
Maatschappij	11.1 [redacted]

2 DEC advies

DEC-advies	CITAAT. -De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met plasmodium soorten die gekenmerkt worden door aanwezig zijn van slapende leverstadia, en die een grote gelijkenis vertonen met dergelijke plasmodium soorten bij de mens. Deze apen parasieten kunnen zelf ook in beperkte mate in de mens voorkomen. De kandidaat geneesmiddelen worden in eerste instantie getest in een in vitro model, waarvoor echter bloed van een geïnfecteerd dier nodig is. Daarnaast zal door in vivo experimenten worden vastgesteld of en in hoeverre de geselecteerde kandidaat geneesmiddelen in aanmerking komen voor verdere klinische evaluatie. De resultaten verkregen in dit proefdiermodel kunnen in belangrijke mate een beschermend effect tegen deze vorm van malaria in de mens voorspellen. Eventueel waargenomen bijwerkingen zijn eveneens relevant voor de mens. -Of een kandidaat geneesmiddel werkzaam is tegen hypnozoieten kan alleen getest worden in makaken, aangezien malaria parasieten die deze vorm van malaria veroorzaken en bovendien sterk lijken op de bij de mens voorkomende parasiet alleen in makaken voor komen. Door de experimenten in niet-humane primaten kunnen inzichten in effectiviteit en mogelijke bijwerkingen naar voren komen die bij onderzoek met andere diersoorten gemist zouden zijn. Deze stap over te slaan en direct onderzoek met menselijke vrijwilligers te verrichten is in dit stadium van de ontwikkeling de kandidaat geneesmiddelen dan ook niet verantwoord. -Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Ook gebruik in een eerdere malaria studie vormt, na een rustperiode van 6 maanden, geen belemmering voor hergebruik. Het werkelijke aantal dieren die binnen dit project gebruikt gaan worden zal daardoor lager uitvallen. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven. Ethische afweging van de DEC: 1. Rechtvaardigt het testen van nieuwe kandidaat geneesmiddelen tegen malaria het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het

gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen.

2. De waarden voor de samenleving zijn gelegen in het ontwikkelen van medicijnen die het mogelijk maken om personen te genezen die met malaria soorten besmet zijn die slapende stadia in de lever ontwikkelen. Momenteel is er maar 1 medicijn beschikbaar tegen deze vorm van malaria en dat heeft veel bijwerkingen en de parasiet wordt er resistent tegen. Vele miljoenen mensen lijden aan deze vorm van malaria en dit heeft een grote impact op welzijn en op economische productiviteit. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn van de samenleving (minder zieken, minder doden).

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze kunnen in lichte mate ziek worden door infectie met malaria en enige pijn ondervinden door bloedafnames en injecties. De dieren ondervinden hiervan licht tot matig ongerief.

De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de moleculaire pathways binnen de parasiet die belangrijk zijn als aangrijpingspunt voor nieuwe medicijnen tegen malaria. Deze inzichten kunnen leiden tot verdere ontwikkeling en verbetering van nieuwe klassen anti-malaria middelen.

Indien door dit onderzoek nieuwe werkzame stoffen gevonden worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van medicijnen die mensen kunnen genezen van malaria infectie en die een alternatief kunnen vormen voor het huidige middel, waar de parasieten resistent tegen worden. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

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

Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat het ontwikkelen van effectieve medicijnen met malaria geïnfecteerde mensen kan genezen. Daarnaast kan dit onderzoek meer inzicht geven in de moleculaire pathways die door deze medicijnen worden aangegrepen, hetgeen de verdere ontwikkeling van nog betere medicijnen zal

bevorderen.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door het feit dat de gebruikte onderzoekmodellen voor een groot deel door de onderzoeker zelf zijn opgezet en gebruikt voor screening van nieuwe kandidaat medicijnen tegen malaria. De onderzoeker en het instituut bezitten de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor het verkrijgen van de benodigde malaria parasieten, al dan niet genetisch gemodificeerd, en voor het in vivo testen van de effectiviteit van kandidaat medicijnen, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met sterk op de humane malaria parasiet gelijkende parasieten die vergelijkbare slapende stadia in de lever geven. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. De dieren zullen in leven blijven aan het einde van het project.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. De te gebruiken modellen voor in vitro en in vivo screening zijn deels binnen dit instituut opgezet en reeds eerder toegepast. Deze modellen maken het mogelijk om naar schatting 150.000 nieuwe kandidaat geneesmiddelen te testen. Uiteindelijk dienen de meest veelbelovende kandidaten in vivo op therapeutische werking getest te worden voordat overgegaan kan worden op klinisch onderzoek. Dit onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in de resusaap, aangezien alleen deze diersoort gevoelig is voor deze voor de mens relevante vormen van malaria en modelleert voor ‘slapende vormen’ van de parasiet, de hypnozoieten. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoort, de dieren zijn afkomstig uit eigen fok, de 3V-principes worden gehonoreerd door toepassing van ontwikkelde in vitro modellen, hergebruik van dieren, en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen (positive reinforcement). Het ongerief is maximaal matig maar kan ook vaak tot licht beperkt blijven. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven.

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

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij
- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd
De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over de volgende onderwerpen: aanvullende informatie betreffende

	de onderlinge samenhang tussen de studie onderdelen en de mogelijkheid tot parallelle uitvoering, het uitvoeren van PK studies in geïnfecteerde dieren en de mogelijkheid om physiologically based pharmacokinetic modelling toe te passen, aanvullende informatie over milieueffecten, hergebruik en humane eindpunten. Het DEC advies is Positief Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	11.1
	Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. CITAAT. Een van de DEC leden is betrokken bij de aanvraag. Deze persoon heeft zich teruggetrokken van de vergadering bij de bespreking van de aanvraag en heeft geen aandeel gehad in de afweging en advisering.
Het DEC advies is helder en navolgbaar.	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	10.2.g
Doelstelling Doelstelling	CITAAT. De algemene doelstelling van dit project is het screenen van potentieel nieuwe geneesmiddelen op activiteit tegen malaria hypnozoieten, om ze dan verder te kunnen ontwikkelen tot medicijnen.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	CITAAT. Malaria is één van de belangrijkste infectieziekten, veroorzaakt door 5 verschillende humane malaria parasieten. Deze parasitaire ziekte komt voor in de tropen en subtropen en treft vooral de armste bevolking op aarde. Het grote aantal ziektegevallen zorgt ervoor dat kinderen niet naar school kunnen en volwassenen niet goed kunnen deelnemen aan het arbeidsproces. Dit heeft een desastreuze invloed op de sociaal-economische ontwikkeling van de getroffen landen waar malaria in grote mate voorkomt. Dodelijke slachtoffers, zo'n 500.000 per jaar, zijn vooral kinderen jonger dan 5 jaar in Afrika ten zuiden van de Sahara. Er bestaan nog geen goed werkende vaccins en de malaria parasieten worden in hoog tempo resistent tegen bestaande geneesmiddelen; onderzoek dat leidt tot nieuwe vaccins en geneesmiddelen is dan ook zeer urgent om de ziekte onder controle te houden en uiteindelijk uit te roeien. Buiten Afrika is Plasmodium vivax de meest voorkomende malaria parasiet die mensen infecteert. Deze parasiet veroorzaakt niet zo vaak dodelijke slachtoffers, maar heeft door de ernstige ziekte die hij toebrengt, een grote socio-economische impact op de endemische gebieden. P. vivax heeft een unieke eigenschap die niet voorkomt bij de humane malaria parasiet die de meeste dodelijke slachtoffers veroorzaakt (P. falciparum); hij vormt namelijk slapende parasieten (hypnozoieten) in de lever na een infectie. Deze parasieten vormen een verborgen parasieten reservoir (lever infecties verlopen asymptomatisch) en zijn een ernstige complicatie bij de uiteindelijke uitroeiing van malaria met medicijnen en vaccins. Er is maar 1 geneesmiddel geregistreerd dat hypnozoieten kan doden, primaquine, maar dat middel heeft vele bijwerkingen en parasieten beginnen hier resistent tegen te worden. Het hier beschreven onderzoek is erop gericht om nieuwe, veilige geneesmiddelen te ontwikkelen tegen hypnozoieten, door meer kennis op te doen over de (moleculaire) biologie van de hypnozoiet en door grote hoeveelheden potentiële geneesmiddelen te screenen op de hypnozoiet, en actieve middelen verder te testen op de werking. De opgedane biologische kennis zal mogelijk zwakke plekken in de hypnozoiet bloot leggen, die aangepakt kunnen worden met nieuwe geneesmiddelen. Positieve resultaten uit dit onderzoek zullen leiden tot het terugdringen van het aantal met P. vivax-geïnfecteerde mensen, waardoor vivax malaria verder onder controle gebracht kan worden en uiteindelijk hopelijk geëlimineerd.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Voldoende onderbouwd.

Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	De DEC zegt hierover het volgende: De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn boven iedere twijfel verheven gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's. 11.1
3V's Vervanging	
	3.4.4.1. Malaria infectie van resusapen: CITAAT. Door het beperkte gastheer bereik van P. cynomolgi zijn alleen makaak soorten, met name resusapen, te gebruiken voor dit type onderzoek. Er bestaan wel malaria soorten die knaagdieren infecteren, maar die vormen geen hypnozoieten. Deze komen alleen voor bij malaria soorten die mensen en apen infecteren. Voor het screenen van geneesmiddelen hebben is een in vitro platform ontwikkeld, maar om aan de benodigde parasieten te komen is steeds een parasiet donor aap nodig, omdat P. cynomolgi niet in vitro gekweekt kan worden. Het gebruik van een in vitro test voor het screenen van chemische/biologische stoffen op activiteit tegen hypnozoieten vervangt het vroeger gebruikte in vivo model (P. cynomolgi in resusapen) voor screenen en dit heeft geleidt tot een zeer grote reductie in het gebruik van proefdieren.
	3.4.4.2. PK/PD studie in resusapen: CITAAT. Indien met geïnfecteerde apen gewerkt wordt: Door het beperkte gastheer bereik van P. cynomolgi zijn alleen makaak soorten, met name resusapen, te gebruiken voor dit type onderzoek. Er bestaan wel malaria soorten die knaagdieren infecteren, maar die vormen geen hypnozoieten. Deze komen alleen voor bij malaria soorten die mensen en apen infecteren. Voor de PK/PD studie worden resusapen gebruikt omdat het metabolisme veel lijkt op dat van de mens, en de effectiviteitsstudie ook in resusapen plaats vindt (bijlage 3). Indien mogelijk zullen in vivo PK studies vervangen worden door zgn. in silico PBPK studies (physiologically based pharmacokinetic modeling), waarbij wiskundige modellen de absorptie, distributie, metabolisme en excretie van stoffen in mensen en dieren proberen te voorspellen.
	3.4.4.3. In vivo effectiviteitsstudie in resusapen: Zie 3.4.4.1.

Verminderen	
	3.4.4.1. Malaria infectie van resusapen: CITAAT. . De parasiet donor apen worden zeer efficiënt gebruikt; er wordt een maximale hoeveelheid muggen gevoed die we in 1 experiment kunnen hanteren (1000-1500). Waar mogelijk, worden donor apen van verschillende experimenten gecombineerd, bijvoorbeeld de donor aap voor de productie van sporozoieten voor in vitro drug screening en een in vivo effectiviteit studie. Van de transfectie donor apen wordt een maximale hoeveelheid bloed afgenomen (0,7% van het lichaamsgewicht per bloeding en niet meer dan 1% binnen een periode van 4 weken) bij de maximale parasitemie in de donor aap (tussen de 0,7% en 3%, afhankelijk van de aap). Hieruit worden dan de bloedstadiumparasieten gezuiverd, om afhankelijk van de transfectie methode die voor het specifieke experiment nodig is). Het efficiënte gebruik van donor apen vermindert het aantal benodigde donor apen voor transfectie studies. Indien de parasitemie het toelaat in de ontvanger apen na transfectie, zullen we ook al muggen voeden op het bloed van de primaire ontvangers, om al pilot studies op leverstadia van getransfecteerde parasieten uit te kunnen voeren. Dit kan alleen als de parasieten na transfectie voldoende uitgroeien in de primaire ontvanger apen. Als voor bepaalde transfectanten al voldoende informatie verkregen is zal een secundaire ontvanger niet gebruikt worden.
	3.4.4.2. PK/PD studie in resusapen: CITAAT. Met 3 dieren kan een goede dosisbepaling uitgevoerd worden. Als er 1 uitbijter is, kan nog steeds die bepaling plaatsvinden; met 2 dieren zou dat niet meer kunnen. Als met geïnfecteerde dieren gewerkt wordt is een profylactische studie tijdens de effectiviteitsstudie niet meer nodig.
	3.4.4.3. In vivo effectiviteitsstudie in resusapen: CITAAT. Met een powercalculatie zoals hierboven beschreven wordt het minimale aantal dieren per groep bepaald dat nodig is om tot significante uitkomsten te komen.

Verfijnen	
	3.4.4.1. Malaria infectie van resusapen: CITAAT. Het bloedstadium parasitemie verloop van P. cynomolgi in resusapen is redelijk voorspelbaar, zowel bij bloedstadium als bij sporozoiet infecties. Hierdoor kunnen we het aantal benodigde bovenbeen prikjes om de parasitemie te volgen tot een minimum beperken, in ieder geval voor de wildtype parasiet infecties. Voor de getransfecteerde parasieten is dit minder voorspelbaar, maar daar plannen we bovenbeen prikjes op strategische momenten rond periodes waarop parasieten verwacht worden, om de dieren zo min mogelijk lastig te vallen en toch de parasitemie ontwikkeling zo goed mogelijk te kunnen volgen. Bovendien maken we gebruik van getrainde dieren (positive reinforcement training), die vrijwillig hun bovenbeen aanbieden voor een prikje, waarna ze een beloning ontvangen. Dit vermindert de stress bij de dieren. De muggenvoedingen gebeuren ex vivo, zodat de dieren geen last hebben van (veel) muggenbeten. Na infectie worden de dieren dagelijks gescoord op klinische symptomen m.b.v. een klinische scoringslijst.
	3.4.4.2. PK/PD studie in resusapen: CITAAT. In overleg met de ontwikkelaar van de geneesmiddelen worden minimale hoeveelheden bloed op zo min mogelijk tijdstippen afgenomen, waarbij toch tot een goede PK/PD analyse gekomen kan worden. Omdat we bij geïnfecteerde dieren in grote lijnen weten wanneer we parasieten in het bloed kunnen verwachten, kunnen we de timing van de bovenbeen prikjes daarop afstemmen, waardoor in totaal minder dij prikjes nodig zijn, terwijl we toch de parasitemie ontwikkeling goed vast kunnen leggen. De dieren zijn getraind voor het meewerken aan bovenbeen prikjes. Voor de orale toediening van primaquine worden de dieren ook getraind voor het vrijwillig drinken uit een spuit. Om de bittere smaak van primaquine enigszins te maskeren, wordt een zoete siroop gebruikt.
	3.4.4.3. In vivo effectiviteitsstudie in resusapen: CITAAT. We maken gebruik van getrainde dieren die vrijwillig hun bovenbeen aanbieden voor een prikje met een naald om een druppel bloed af te nemen (positive reinforcement training). Daarna krijgen ze een beloning. Deze procedure vermindert de stress bij de dieren voor dit soort procedures. Omdat we in grote lijnen weten wanneer we parasieten in het bloed kunnen verwachten, kunnen we de timing van de prikjes daarop afstemmen, waardoor in totaal minder prikjes nodig zijn, terwijl we toch de parasitemie ontwikkeling goed vast kunnen leggen. Voor de orale toediening van primaquine worden de dieren getraind voor het vrijwillig drinken uit een spuit. Om de bittere smaak van primaquine enigszins te maskeren, wordt een zoete siroop gebruikt.

Wettelijk vereist onderzoek Indien ja, is er sprake van herhaling?	Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.4.1. Malaria infectie van resusapen: CITAAT. Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1e van de Wet op de Dierproeven. In geval van eerder gebruik in malaria studies, moet een voorafgaande malaria infectie minimaal 6 maanden geleden zijn uitgevoerd, om zo min mogelijk last te hebben van ontwikkelende immuniteit tegen malaria parasieten.	
3.4.4.2. PK/PD studie in resusapen: CITAAT. Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1e van de Wet op de Dierproeven. In geval van eerder gebruik in malaria studies en er gewerkt wordt met geïnfecteerde dieren in de PK/PD studie, moet een voorafgaande malaria infectie minimaal 6 maanden geleden zijn uitgevoerd, om zo min mogelijk last te hebben van ontwikkelende immuniteit tegen malaria	
3.4.4.3. In vivo effectiviteitsstudie in resusapen: Zie 3.4.4.1	

Naam proef	**Worden de dieren gedood?**	**Doden volgens richtlijn?**
3.4.4.1. Malaria infectie van resusapen	Nee	
3.4.4.2. PK/PD studie in resusapen	Nee	
3.4.4.3. In vivo effectiviteitsstudie in resusapen	Nee	

Naam proef		
3.4.4.1. Malaria infectie van resusapen	HEP: <1%	CITAAT. Als een dier onverwachts ernstig ziek wordt met een extreem hoge parasitemie die niet meer op tijd behandeld kan worden, geldt dit als humaan eindpunt.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 20% Matig 80% Licht	
3.4.4.2. PK/PD studie in resusapen	HEP: <1%	Zie 3.4.4.1.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100% Matig	
3.4.4.3. In vivo effectiviteitsstudie in resusapen	HEP: <1%	Zie 3.4.4.1
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100% Matig	

5 Samenvatting

11.1

.

11.1 [redacted]

[redacted].

11.1 [redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

15

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre
T.a.v. 10.2.e
Postbus 3306
2288 GJ RIJSWIJK

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
AVD5020020172664

Bijlagen
1

Datum 17 oktober 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 17 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Plasrnoclium cynomolgi als model voor P. vivax malarla voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia" met aanvraagnummer AVD5020020172664. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

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

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 december 2017 tot en met 30 november 2022.
De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Aanvullende opmerkingen
Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie (DEC) 10.2.g gevoegd. Dit advies is ontvangen op 17 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Nadere vragen aanvrager
Op 13 september 2017 en 19 september 2017 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op de strategie, de keuzemomenten, de herkomst van de dieren en het benodigd aantal dieren. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen
Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf
Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d van de wet. Deze beoordeling zal uiterlijk november 2023 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

Datum:
17 oktober 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172664

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
namens deze:

10.2.g

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 december 2017 tot en met 30 november 2022, voor het project "Plasrnoclium cynomolgi als model voor P. vivax malarla voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia" met aanvraagnummer AVD5020020172664, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Afdeling shoofd.
Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 17 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
   a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 17 augustus 2017;
   b Bijlagen dierproeven
      - 3.4.4.1. Malaria infectie van resusapen, zoals ontvangen op 17 augustus 2017;
      - 3.4.4.2. PK/PD studie in resusapen, zoals ontvangen op 17 augustus 2017;
      - 3.4.4.3. In vivo effectiviteitsstudie in resusapen, zoals ontvangen op 17 augustus 2017;
   c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 17 augustus 2017;
   d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 17 augustus 2017
   e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 september 2017, 20 september 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1. Malaria infectie van resusapen			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	173	20,0% Matig 80,0% Licht
3.4.4.2. PK/PD studie in resusapen			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	15	100,0% Matig
3.4.4.3. In vivo effectiviteitsstudie in resusapen			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	60	100,0% Matig

Aanvraagnummer:
AVD5020020172664

Voorwaarden

Beoordeling achteraf
In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk november 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Ter informatie
Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

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

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD5020020172664

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:
AVD5020020172664

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 blijven 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.

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

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

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

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

	Inventaris Wob-verzoek W19-02								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	documenten NTS20172687	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage dierproeven 1			x					
5	Bijlage dierproeven 2				x			x	
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging								
8	Advies CCD				x				x
9	Beschikking en vergunning				x		x		

2687

Centrale Commissie Dierproeven

1

13 SEP. 2017

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

X Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 50200

☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

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

Naam instelling of organisatie	Biomedical Primate Research Centre
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e
KvK-nummer	41146967

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

Straat en huisnummer	Lange Kleiweg 161
Postbus	3306
Postcode en plaats	2288 GJ Rijswijk
IBAN	10.2.g
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting Biomedical Primate Research Centre

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	10.2.e ☐ Dhr. X Mw.
Functie	10.2.g
Afdeling	
Telefoonnummer	10.2.e
E-mailadres	

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

(Titel) Naam en voorletters	X Dhr. ☐ Mw.
Functie	10.2.g
Afdeling	
Telefoonnummer	10.2.e
E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

2.1	Wat voor aanvraag doet u?	X Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3 ☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 ☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
2.2	Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier ☐ Nee > Ga verder met vraag 3
2.3	Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	☐ Nee > Ga verder met vraag 3 ☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum 1 - 1 - 2018 Einddatum 1 - 1 - 2023
3.2	Wat is de titel van het project?	Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC 10.2.g Postadres E-mailadres 10.2.e

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

X Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287,00 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

☐ Via een eenmalige incasso

X Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

X Projectvoorstel

X Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

X Bijlagen: 1) Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde marmosets.
2) Therapie evaluatie in het marmoset MPTP-model.

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	10.2.e
Functie	10.2.g
Plaats	Rijswijk
Datum	12 - 9 - 2015
Handtekening	10.2.e en 10.2.g

Centrale Commissie Dierproeven

Format
Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproever te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	Vul de titel van het project in.	Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- ☐ Fundamenteel onderzoek
- X Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- ☐ 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 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Wat is de ziekte van Parkinson? De ziekte van Parkinson is een zeer ernstige chronische aandoening van het centrale zenuwstelsel waarbij de motorcoördinatie is verstoord. Deze ernstige, invaliderende ziekte wordt daarom ook wel een bewegingsstoornis genoemd. De ziekte treft vooral ouderen vanaf 55 jaar met een incidentie van 1 op 500. In ongeveer 5% van de gevallen begint de ziekte al op jongere leeftijd waarbij een erfelijke component een rol speelt [1]. Echter, bij 95% van de patiënten is de oorzaak onduidelijk [2]. Bij deze idiopathische vorm van de ziekte van Parkinson zijn de eerste symptomen , zoals depressie, slaapverstoring, geheugenproblemen en constipatie, niet specifiek voor de ziekte [3]. Pas zodra de motor-symptomen optreden zoals stijfheid, het niet goed kunnen opstarten van een beweging en tremoren, vindt de diagnose van de ziekte van Parkinson plaats. Op dat moment is reeds de helft van de dopamine producerende hersencellen, die deze symptomen veroorzaken, afgestorven [4]. Deze hersencellen bevinden zich in een kern in de hersenen, de zgn. substantia nigra, die samen met het striatum betrokken is bij de coördinatie van bewegingen. Aangezien het een progressieve ziekte is, worden in de loop der jaren de symptomen van de ziekte alleen maar erger. De patiënt kan niet meer voor zichzelf zorgen en de voorhanden zijnde medicatie is niet meer toereikend om de in ernst toenemende symptomen tegen te gaan. Vanwege de lichamelijke en de psychische beperking door cognitieve achteruitgang en depressie wordt het sociale leven ernstig aangetast. De patiënt is daarnaast sterk afhankelijk van de hulp van anderen en kan niet meer zelfstandig leven.

Oorzaak van de ziekte van Parkinson: De precieze oorzaak van de ziekte van Parkinson is onbekend, maar omvat in ieder geval de interactie tussen meerdere factoren zoals genetische- en omgevingsfactoren [5]. De wisselwerking tussen verschillende factoren, zoals ontstekingsreacties, oxidatieve stress, calciumhuishouding, verminderde energieproductie in de cellen en eiwit ophopingen [5], leiden uiteindelijk tot het afsterven van dopamine producerende neuronen in de substantia nigra waardoor de typische Parkinson-symptomen optreden. De precieze oorzaak kan per patiënt verschillen, maar ouderdom is een belangrijke risicofactor. Daarom wordt de ziekte van Parkinson ook weleens ouderdomsziekte genoemd.

Pathologische aspecten van de ziekte van Parkinson: De pathologie van de ziekte van Parkinson kenmerkt zich door het afsterven van dopamine producerende cellen in de substantia nigra. Hierdoor wordt er minder dopamine geproduceerd leidend tot minder activatie van het striatum voor het aansturen en coördineren van motorische functies [6]. Maar bij deze patiënten functioneren ook andere hersengebieden minder goed waardoor ook cognitieve functies verstoord zijn (zoals planning) en er slaapverstoringen optreden. Dit gebeurt al heel vroeg in het ziekteproces [7-9].

Behandeling: Op dit moment zijn er alleen medicijnen beschikbaar die de symptomen onderdrukken. Het meest gebruikte medicijn is L-DOPA (levodopa). L-DOPA wordt opgenomen door de nog aanwezige hersencellen in de substantia nigra en in die hersencellen omgezet tot dopamine. Door een nog onbekend mechanisme veroorzaakt deze extern toegediende L-DOPA op termijn dyskinesia, dit is een vervelende bijwerking resulterend in onwillekeurige bewegingen [10]. Andere medicijnen om dit te ondervangen zijn dopamine agonisten die een vergelijkbaar effect als dopamine hebben. Ook deze medicijnen geven echter veel bijwerkingen en zijn daarnaast minder effectief. Daarom is het van belang om nieuwe behandelmethodes te ontwikkelen die de kwaliteit van leven van de patiënt verbeteren.
Naast de huidige symptoom-onderdrukkende middelen is er nog geen medicijn beschikbaar dat het ziekteproces tegengaat. Om het ziekteproces te kunnen beïnvloeden moeten er nog voldoende dopamine-producerende hersencellen over zijn. Daarom wordt er veel onderzoek gedaan naar zowel vroege diagnostiek en naar behandelmethodes om de progressie te stoppen. Naast farmacologische behandelingen worden er bij zeer ernstige gevallen ook niet-farmacologische methodes gebruikt zoals 'deep brain stimulatie' (DBS) waarbij een bepaalde kern in de hersenen elektrisch wordt gestimuleerd met als gevolg een vermindering van de symptomen. Ondanks het positieve effect is het precieze werkingsmechanisme van deze methode nog onbekend. Meer inzicht hierin zal de ontwikkeling van nieuwe aangrijpingspunten voor behandeling vergroten.

In vitro modellen: Voor een snelle screening van nieuwe geneesmiddelen wordt gebruik gemaakt van neuronale cellijnen *in vitro*, zoals de dopaminerge PC12 cellijn. Deze cellijnen worden behandeld met een toxische stof (MPP+). Door potentiele geneesmiddelen aan deze cellen toe te voegen kan het tegengaan van de toxische effecten van MPP+ vergeleken worden. Na deze *in vitro* screening kan een selectie van de meest veelbelovende kandidaat geneesmiddelen om verder *in vivo* te testen gemaakt worden.

Verdere *in vivo* testen is nodig omdat verstoring van de interacties tussen cellen en verschillende hersengebieden een cruciaal aspect zijn bij de ziekte. Ook hersenorganoïden (mini-hersenen) kunnen op dit moment nog niet de vele en complexe interacties tussen de verschillende hersengebieden nabootsen.

In vivo modellen: Van 95% van de patiënten met de ziekte van Parkinson is de oorzaak onbekend, maar het klinische en pathologische beeld evenals factoren die hierbij mogelijk een rol bij spelen zijn bekend. Deze vorm van de ziekte van Parkinson kan in een diermodel chemisch geïnduceerd worden met een neurotoxische stof die zorgt dat de dopamine productie in het striatum vermindert zoals ook bij de ziekte van Parkinson te zien is. De meest gebruikte neurotoxische stoffen om te modelleren voor de ziekte van Parkinson zijn reserpine, 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) en 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), ieder met eigen, specifieke effecten. Reserpine vermindert alleen de dopamine productie zonder schade aan de cellen aan te brengen en is daardoor alleen geschikt om symptoom onderdrukkende medicijnen te testen. Reserpine modelleert niet de ziekte van Parkinson maar een vorm van parkinsonisme.
6-OHDA is niet selectief en moet daarom intracraniaal worden geïnjecteerd waarbij schade plaatsvindt in het geïnjecteerde gebied. Injectie gebeurt in één hersenhelft omdat het anders leidt tot vroegtijdige sterfte. Omdat 6-OHDA niet selectief is voor dopamine producerende cellen is het moeilijk te standaardiseren voor schade inductie.
MPTP is wel selectief voor dopamine producerende cellen. MPTP passeert gemakkelijk de bloed-hersen barrière en wordt daar in gliacellen omgezet in het toxische metaboliet MPP+. MPP+ wordt selectief via de dopamine transporter opgenomen in dopamine cellen waarna de cel afsterft. MPTP is ontdekt in de jaren tachtig bij heroïnegebruikers in California. Deze mensen hadden per ongeluk verkeerde synthetische heroïne (MPPP) gebruikt die vervuild was met het bijproduct MPTP. Hierdoor ontwikkelden zij een ziektebeeld dat niet te onderscheiden was van de ziekte van Parkinson [12]. Sinds die tijd is het MPTP-model het aangewezen model voor deze ziekte. Het voordeel van MPTP tegenover andere inductie modellen is de selectiviteit voor dopamine producerende cellen, zoals hierboven aangegeven. In dit project wordt gebruik gemaakt van MPTP om de ziekte van Parkinson te induceren.

Door de selectiviteit van MPTP voor dopamine-producerende cellen kan deze stof eenvoudig systemisch worden toegediend. Verschillende diersoorten zijn gevoelig voor MPTP, zoals de muis, de kat en de primaat. De rat is echter ongevoelig voor MPTP [16] (Tabel 1). MPTP-geïnduceerde sterfte van dopamine producerende cellen in de substantia nigra in deze diermodellen is vergelijkbaar met die in de Parkinson patient [18]. Daarnaast komen de klinische symptomen van de ziekte van Parkinson zoals verstoorde motorfunctie, tremoren, apathie en verminderde gelaatsuitdrukking, alleen in het aap model overeen met die in Parkinson-patiënten [13]. In tegenstelling tot bij de aap en de mens, verdwijnen bij de kat optredende symptomen spontaan binnen 2 weken en bij knaagdieren gebeurt dit zelfs al binnen twee dagen [16]. Hierdoor kan bij de kat en de muis alleen post-mortem een mogelijk effect van de behandeling worden aangetoond, en kan de progressie van de ziekte niet worden gevolgd. Omdat symptomen in de aap niet spontaan verdwijnen is dit MPTP-model geschikt om de progressie van de ziekte en de effecten van behandeling over een lange periode te volgen. Ook zijn vroege preklinische symptomen van de ziekte van Parkinson bij de mens, zoals verstoorde slaap, alleen waargenomen bij apen en niet in andere diersoorten. Dit is van belang voor het testen van behandelingen die ingrijpen op het vroege ziekteproces [9, 15]. Verder ontstaat er alleen in apen de door L-DOPA veroorzaakte bijwerkingen van dyskinesia [17]. Het MPTP-model in de marmosetaap bootst zowel de selectieve hersenschade als de optredende Parkinsonsymptomen na [11] en is daarom geschikt voor de idiopathische vorm van de ziekte van Parkinson. Daarnaast is de aap geschikt voor gedragsonderzoek om klinisch relevante gedragstaken te testen. Voorbeelden van test methodes die speciaal voor de aap ontwikkeld zijn: de hand-oog coördinatie taak, de locomotor activiteit, de 24-uurs activiteit voor het circadiane ritme, opricht reflex, spring activiteit voor akinesia (opstarten van een beweging), cognitie met behulp van een touch screen computertaak, slaap gedrag met behulp van telemetrische hersenactiviteit registratie [9, 13, 21-23]. Een ander belangrijk aspect in het marmoset model is de overeenkomst in hersenstructuur tussen aap en mens. Een belangrijke hersengebied betrokken bij de bewegingscoordinatie is het striatum. Bij de apen en de mens bestaat deze uit meerdere structuren. In knaagdieren is dit slechts een enkelvoudige structuur waardoor er geen onderscheid bestaat tussen het putamen en de caudate nucleus [10, 19-20].

Het MPTP-model in marmosets dat toegepast wordt in dit project is het resultaat van een stapsgewijs verfijningsproces en heeft zich de afgelopen twee decennia ontwikkeld tot een zeer solide en valide model voor de ziekte van Parkinson [5, 11, 13-15].

Tabel 1. Effect overzicht van MPTP-geïnduceerde ziekte van Parkinson in verschillende species

	Soort				
Effect	**Rat**	**Muis**	**Kat**	**Aap**	**Mens**
Pre-Klinische symptomen (zoals slaapstoornis)	-	-	?	+	+
Klinische symptomen	-	2 dagen	2 weken	Persistent	Persistent
Schade aan substantie nigra (dopamine-producerende cellen)	-	+	+	+	+
L-DOPA-geïnduceerde dyskinesia	-	-	-	+	+

Er zullen twee varianten van het MPTP-inductie protocol gevolgd worden: het meest gangbare subacute model waarbij MPTP binnen een tijdsspanne van 2 weken wordt toegediend [10, 13, 24-25], en een chronisch progressief model waarbij lage doseringen MPTP een- tot tweemaal wekelijks wordt toegediend gedurende 2 tot 12 weken [15, 26]. Het chronische progressief model wordt gebruikt om ziekte beïnvloedende factoren te testen en inzicht te krijgen over de moleculaire veranderingen tijdens de ziekteprogressie. Door de langzame ziekte inductie over meerdere weken is er ruimte om een geneesmiddelmiddel, die de ziekte afremt, te kunnen testen. Bij het sub-acute inductie protocol wordt de ziekte binnen een tijdsbestek van twee weken geïnduceerd waardoor al vrij snel de volledige symptomen waarneembaar zijn. Het subacute model is daarom vooral geschikt voor het testen van anti-Parkinson middelen (symptoom onderdrukkende middelen) en therapieën tegen dyskinesie. Het is namelijk alleen mogelijk om dyskinesie te induceren met L-DOPA in de aanwezigheid van een beschadigde substantia nigra. Dit kan je het snelst bereiken door snelle inductie gevolgd door herhaalde L-DOPA toedieningen.

Voorbeelden van type studies waarin het marmoset MPTP-model ingezet wordt zijn:

- Onderzoek aan geneesmiddelen/behandelingen die met de huidige technologieën steeds specifieker voor de mens worden gemaakt waardoor ze in knaagdieren hun aangrijpingspunt niet meer herkennen en in apen wel.

-Onderzoek aan behandelingen die het ziekteproces veranderen waarbij de ziekte progressie gevolgd moet worden op basis van motorische en niet-motorische symptomen. Bij knaagdieren treedt een spontaan herstel van de symptomen op waardoor het volgen van het verloop van de ziekte niet mogelijk is.

-Studies aan de premotor fase waarin nog geen sprake is van verstoring van motorfuncties. Dit is belangrijk om de progressie te verminderen en ziekteontwikkeling te voorkomen. In de marmosetaap zijn preklinische symptomen aangetoond, zoals slaapverstoring, die al optreden voor de motorische symptomen. In de mens zie je ook al tijdens de preklinische fase slaapverstoring en kan middels een PET-CT scan dopamine vermindering worden aangetoond, waardoor een toekomstige behandeling vroeg kan worden ingezet.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

De ziekte van Parkinson is een ernstig invaliderende ziekte bij de mens waarvoor op dit moment slechts beperkte behandelingen beschikbaar zijn. Deze behandelingen bestrijden echter alleen de symptomen en vertonen na verloop van tijd ernstige bijwerkingen. In dit project wordt de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes tegen de ziekte van Parkinson onderzocht in een diermodel voor deze ziekte, namelijk het MPTP-model in de marmosetaap. De resultaten van deze studies worden gebruikt voor selectie van kandidaat geneesmiddelen voor verdere klinische studies. Een potentieel nieuwe therapie wordt alleen onderzocht in het aapmodel als in andere diermodellen geen ernstige bijwerkingen naar voren gekomen zijn en er aanwijzingen zijn dat het middel effectief kan zijn tegen de ziekte van Parkinson. Het concrete doel van dit project is selectie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson voor verdere klinische studies. Het is de verwachting dat binnen de looptijd van dit project 6 nieuwe methoden onderzocht gaan worden. Het uiteindelijke doel van het onderzoek is dat therapieën beschikbaar komen waarmee de symptomen van de ziekte van Parkinson voor de patiënt worden verlicht en de verdere achteruitgang wordt verminderd of voorkomen.

Binnen het instituut bestaat uitgebreide ervaring met het werken met niet-humane primaten en grote expertise op het gebied van het marmoset MPTP-model. De hoofdonderzoeker heeft meer dan 20 jaar ervaring met het marmoset MPTP-model [5, 13, 15, 26-31].
De infrastructuur en de expertise zijn aanwezig om deze studies veilig en binnen de gestelde termijn uit te voeren.

Referenties bij 3.1 en 3.2

10.2.g

10.2.g

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

In Nederland leven ongeveer 32.000 mensen met de ziekte van Parkinson, dat is op dit moment 1 op de 500 mensen. Aangezien het een ouderdoms ziekte is, wordt er op korte termijn een verdubbeling verwacht vanwege de vergrijzende samenleving. De ziekte treft vooral ouderen vanaf 55 jaar, die nog lang een bijdrage aan de maatschappij hadden kunnen leveren. Voor de Parkinsonpatiënt betekent dit een verminderde kwaliteit van leven met ernstige incapacitatie van beweging en complicaties zoals ernstige depressie, slaapverstoring, cognitieve achteruitgang, constipatie en incontinentie. Aangezien deze patiënten aangewezen zijn op de hulp van anderen beïnvloedt deze ziekte ook hun directe omgeving. Naarmate de ziekte vordert is zelfstandig wonen niet meer mogelijk maar is intensieve begeleiding noodzakelijk.

De huidige therapieën die ontwikkeld zijn tegen de ziekte van Parkinson onderdrukken slechts de symptomen. Aangezien de ziekte progressief is wordt de ernst van de symptomen alleen maar erger waardoor steeds meer medicatie nodig is voor hetzelfde effect. Hierdoor ontwikkelt zich tolerantie voor het medicijn en moet de patiënt tussendoor regelmatig overstappen op andere medicijnen. Tevens hebben de huidige therapieën veel bijwerkingen zoals hallucinaties en onwillekeurige ongecontroleerde bewegingen, die we dyskinesia noemen. Omdat de ziekte een ernstig verslechterend verloop heeft en de incidentie door de groeiende vergrijzing toeneemt, is het belangrijk dat de ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen de ziekte van Parkinson blijft doorgaan. Het marmoset MPTP-model draagt daaraan bij door enerzijds het testen van de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes (maatschappelijk belang) maar anderzijds ook doordat onderzoek in het model informatie oplevert over het mechanisme wat ten grondslag ligt aan de ziekte (wetenschappelijk belang) en daarmee nieuwe aanknopingspunten voor behandeling gevonden kunnen worden. Bovendien kan met het onderzoek ook ongewenste nevenwerkingen van het medicijn worden ontdekt, zoals in eerdere studies met het marmoset MPTP model is gevonden. Deze informatie is van belang voor het verdere traject van de kandidaatsstof voor klinisch gebruik.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Het project zal bestaan uit meerdere Parkinson-studies waarin per studie één groep marmosets dient als controle en een of meerdere groepen marmosets worden behandeld met de te testen behandeling. In elke studie zal gekeken worden naar de klinische score, diverse gedragsparameters voor motor en niet-motor gerelateerde functies, en de pathologie in het brein. Wanneer nodig zal er voorafgaand aan de Parkinson-studie een dosis-bepaling studie worden uitgevoerd om de dosis en/of toedieningsschema van de therapie te bepalen. Nieuwe middelen worden alleen in het MPTP model onderzocht als er aanwijzingen zijn dat de stof werkzaam kan zijn en er geen aanwijzingen zijn dat de therapie ernstige bijwerkingen kan geven.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapiën op relevante gedrags biomerkers in gezonde marmosets (Bijlage 1):

Indien nog niet bekend, zal het nieuwe middel eenmalig worden ingespoten in gezonde marmosets om de in het bloed circulerende concentratie van het medicijn te bepalen. Herhaaldelijke bloedafnames over de tijd geeft informatie over de bloedspiegel van de teststof over de tijd. Dit is van belang voor de evaluatie van de behandeling in het marmoset MPTP-model. Vervolgens kunnen meerdere doseringen worden vergeleken op relevante biomerkers, zoals verandering in gedrag (bv activiteit), tijdens het optimale moment na toediening. De hoogste dosis die de minste bijwerkingen laat zien wordt gekozen om te testen in het MPTP-model.

Therapie evaluatie in het marmoset MPTP-model (Bijlage 2):
Om de ziekte van Parkinson te induceren worden marmosetapen herhaald geïnjecteerd met MPTP in een dosis variërend tussen de 0,5 en 2 mg/kg (totale dosis van 7-12 mg/kg). Afhankelijk van het tijdsinterval tussen de injecties spreken we van een subacuut inductie protocol, wat leidt tot een duidelijk klinisch beeld van Parkinson-symptomen binnen twee weken, of een chronisch inductie protocol, waarbij slechts 1-2 injecties per week worden toegediend en de Parkinsonsymptomen progressief verlopen. Het subacuut model wordt gebruikt om anti-parkinson middelen te testen. Dit zijn behandelingen die de symptomen onderdrukken. Het chronische model is geschikt om ziekte beïnvloedende factoren te testen. Dit kunnen medicijnen zijn die de ziekte ontwikkeling afremmen, maar ook het effect van risicofactoren zijn (bv bepaalde voeding of slechte slaap) die de ziekteontwikkeling versnellen. Tijdens en na de inductiefase zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd op klinische symptomen behorend tot de ziekte van Parkinson. Indien de hoeveelheid teststof in het bloed gemeten moet worden zal tijdens de dierproef een bloedmonster worden afgenomen. Aan het eind van de studie of wanneer het humane eindpunt is bereikt, worden de dieren geëuthanaseerd waarna het centrale zenuwstelsel wordt onderzocht op de pathologie behorende bij de ziekte van Parkinson. Afhankelijk van de behandeling zullen naast de hersenen ook andere organen, zoals de lever of nier, worden onderzocht op mogelijke neveneffecten van de behandeling.

De behandelingen die worden getest in het marmoset MPTP-model, moeten aan de volgende criteria voldoen:

1. Een medicijn mag niet toxisch zijn dat het ernstige nevenwerkingen, die sterker invaliderend zijn dan de ziekte van Parkinson, veroorzaakt. Vóórdat deze in het aapmodel worden gebruikt moet zij eerst uitgebreid *in vitro* (celkweek) of in kleine proefdieren getest zijn op de afwezigheid van toxiciteit.
2. De therapie is ontwikkeld voor een humaan doel/target molecuul, maar zal ook in de marmoset hetzelfde target molecuul moeten herkennen.
3. Het beoogde target moet vanuit wetenschappelijk oogpunt een bijdrage leveren over de kennis van de ziekte van Parkinson. Het onderzoek van een behandelmethode moet daarom het inzicht over het werkingsmechanisme dat ten grondslag ligt aan de ziekte van Parkinson vergroten.
4. De therapie is specifiek voor primaten waardoor het niet in een ander diersoort kan worden getest. Of de therapie kan niet afdoende worden getest in een ander diersoort vanwege beperkte validiteit in deze diermodellen. Te denken valt aan symptoombestrijding die bij knaagdieren en katten niet getest kan worden omdat de symptomen al spontaan verdwijnen.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Een therapie kan meteen in het marmoset MPTP-model getest worden als er uit eerdere *in vitro* of *in vivo* studies een indicatie is voor een te testen concentratie en toedieningsschema (Bijlage 2). Indien dit niet het geval is kan er voorafgaand aan een therapie evaluatie eerst een dosis- en/of farmacokinetiek bepaling in marmosetapen nodig zijn om de dosis en/of toedieningsschema te bepalen (Bijlage 1). In veel gevallen wordt een teststof door een externe partij aangeleverd om te testen in het MPTP-model. Op dat moment is de teststof al uitgebreid onderzocht op veiligheid en toxiciteit in knaagdieren en zijn er aanwijzingen dat het middel effectief zal kunnen zijn tegen de ziekte van Parkinson. Het kan ook voorkomen dat een aangrijpingspunt voor behandeling onderzocht wordt waarbij gebruik gemaakt wordt van een teststof waarvan bekend is dat deze stof hierop aangrijpt. Hierdoor hopen we nieuwe aanknopingspunten voor de behandeling van de ziekte van Parkinson te kunnen ontdekken ten einde nieuwe medicijnen te kunnen ontwikkelen.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Bepaling van PK en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde marmosets.

2	Therapie evaluatie in het marmoset MPTP model.
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde marmosets.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Dit project bestaat uit twee onderdelen: a) het vaststellen van veranderingen in bloedspiegels van de teststof over de tijd (farmacokinetiek) en b) het bepalen van de dosis waarbij geen gedragsveranderingen optreden die in de therapie evaluatiestudie (Bijlage 2) de waarnemingen zouden kunnen verstoren.

Dit project wordt alleen gedaan indien de optimale werkingstijd en/of het dosis afhankelijke effect op relevante gedragsparameters van een nieuwe potentiële therapie voor de ziekte van Parkinson niet bekend is.

- In het geval van de farmacokinetiek, wordt als primaire uitkomstparameter de aanwezige circulerende niveaus van de teststof in bloed bepaald door regelmatige bloedafname over de tijd. Hierdoor kan het moment waarop de hoogste plasma-niveaus van de teststof in de marmosetaap bereikt zijn worden vastgesteld. Dit wordt gebruikt voor het afstemmen van het tijdstip voor het uitvoeren van de testen in de dosis bepaling en uiteindelijk in de therapie evaluatiestudie (Bijlage 2).
- In het geval van de dosis bepaling van de teststof wordt als primaire uitkomstparameter gekeken naar relevante gedragsveranderingen die ook in de therapie evaluatiestudie (Bijlage 2) zullen worden gemeten. Hierdoor kan worden vastgesteld of en bij welke dosis beïnvloeding van de te meten parameter plaats vindt. De hoogste dosis waarbij geen effect op het gedrag te zien is wordt gekozen voor de therapie evaluatiestudie (Bijlage 2). Als secundaire parameter kan het effect op bloedchemie of celtypes in bloed of hersenen worden onderzocht. Indien organen of hersenen geanalyseerd moeten worden, worden de dieren gedood als onderdeel van de studie.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

- Voor bloedafname of toediening van een teststof en bepaling van het lichaamsgewicht worden de dieren in een speciale koker of balconybox uitgevangen. De dieren worden voor aanvang van het experiment getraind om hieraan vrijwillig mee te werken zodat stress vermeden wordt.
- De toedieningsroute van een teststof wordt per studie bepaald en is afhankelijk van de aard van de teststof. Soms wordt ook een referentie stof in de studie meegenomen. Van zo'n stof is het effect bekend en dient ter vergelijking van de teststof. Tijdens een experiment zal er één toedieningsroute worden gebruikt. Afhankelijk van de toedieningsroute zal de teststof eenmalig of herhaaldelijk worden gegeven. Mogelijke toedieningsroutes zijn intraveneus (i.v.), subcutaan (s.c), intramusculair (i.m), intranasaal (i.n.), oraal of intracraniaal (i.c.). Een i.c. toediening wordt alleen gebruikt als een teststof eenmalig lokaal moet worden toegediend omdat het in de huidige samenstelling niet door de bloed-hersen barrière kan om het werkingsmechanisme van de stof te testen of indien het middel lokaal moet worden toegediend, bijvoorbeeld virale vector therapie. Wanneer mogelijk (in het geval van i.v., s.c., i.m., oraal en i.n.) zal dit zonder sedatie worden uitgevoerd om het dier het ongerief van sedatie te besparen.
- Na de toedieningen zal bloed worden afgenomen. In het geval van de farmacokinetiek bepaling kunnen dit meerdere kleine bloedafnames zijn (< 200 µl, zonder sedatie) in een bepaalde tijdspanne na de toediening. In het geval van dosis bepaling zullen er grotere bloedafnames (0.5 – 2 ml, onder sedatie) plaatsvinden. Er wordt per keer nooit meer dan 0,7% van het lichaamsgewicht aan bloed afgenomen en nooit meer dan 1% binnen een tijdspanne van 4 weken. Tijdens de bloedafnames zullen de dieren ook worden gewogen. Gedurende de gehele studie worden de dieren regelmatig (minimaal 1x/week) gewogen omdat lichaamsgewicht een belangrijke welzijnsparameter is. De dieren worden getraind om vrijwillig aan deze handeling mee te werken.
- Voor en een tot twee uur na toediening wordt het gedrag van de dieren geobserveerd zoals activiteit, interesse in hun omgeving (apathie), aantal 'body postures' zoals geurafzetting, tonen van geslachtsdelen, teruggetrokken houding achterin de kooi.
- Indien directe effecten in de hersenen gemeten moeten worden dan zal de marmoset op een vast tijdstip na toediening gedood worden na volledige sedatie, om over hersenmateriaal te kunnen beschikken voor verdere analyse.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Voor een farmacokinetiek en/of dosis bepaling wordt geen statistische methode gebruikt in de zin van een power analyse. Een testgroep voor een farmacokinetiek bepaling zal bestaan uit een gelimiteerd aantal dieren (n=3-4 per groep) gebaseerd op ervaringen uit eerdere studies waaruit blijkt dat de farmacokinetiek profielen zeer consistent zijn tussen dieren. Afhankelijk van de teststof en de te verwachtte spreiding wordt het aantal dieren 3 of 4. In het geval dat een teststof een hormonale beïnvloeding heeft en in de studie beide seksen worden gebruikt kan de spreiding groter zijn.
Het effect van een teststof op het biologische systeem (dosisbepaling) is meer variabel tussen dieren en vereist daarom groepsgrootte van 4 of 5 dieren, afhankelijk van de therapie en de uitkomstparameters. In de meeste situaties worden twee doseringen van de teststof onderzocht om de meest optimale dosis te kunnen vaststellen. Elk dier is zijn eigen controle. Herhaalde waarnemingen met verschillende doseringen binnen een dier verkleint de spreiding van het effect waardoor het effect nauwkeuriger kan worden vastgesteld. Maar in voorkomende gevallen waarbij het effect op de hersenen wordt vergeleken met de gezonde naïeve situatie is ook een negatieve controlegroep nodig is (hersenen kunnen slechts eenmaal per dier worden onderzocht). De controle hersenen zullen zo veel mogelijk uit de beschikbare biobank worden betrokken.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Common marmoset (*Callithrix jacchus*), volwassen (> 2 jaar), M/V, uit de eigen fokkolonie, n=32
Omdat de therapeutische studie (Bijlage 2) in volwassen marmosetapen wordt uitgevoerd, wordt ook voor de farmacokinetiek en de dosisbepaling de marmoset ingezet (> 2 jaar). Het gemiddelde aantal dieren per testgroep is 4 (voor de farmacokinetiek bepaling 3 tot 4 dieren en voor de dosisbepaling 4 tot 5 dieren).

Geschatte aantal studies in 5 jaar: 4. Iedere studie zal worden uitgevoerd met een geschat aantal van 4 marmosetapen per groep. Er zullen maximaal twee concentraties per therapie worden getest. In totaal zijn er dan 4 (aantal studies) x 8 (farmacokinetiek en dosisbepaling) = maximaal 32 marmosetapen in 5 jaar nodig. Waar mogelijk is elk dier zijn eigen controle.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ Nee, ga door met vraag D.

X Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1e van de Wet op de Dierproeven.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

X Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging

In veel gevallen wordt een teststof door een externe partij aangeleverd om te testen in het MPTP-model. Een therapie kan meteen in het marmoset MPTP-model getest worden als er uit eerdere *in vitro* of *in vivo* studies met knaagdieren een indicatie is voor een te testen concentratie en toedieningsschema. De hieruit vastgestelde gegevens kunnen worden gebruikt voor een indicatie voor de dosis en het tijdstip voor het optimale effect van de stof in de marmosetaap. Echter wanneer dit niet voldoende informatie oplevert voor een therapie evaluatie in het MPTP-model, dient er voorafgaand aan een therapie evaluatie (Bijlage 2) eerst een farmacokinetiek en/of dosisbepaling op relevante gedrags biomerkers in de gezonde marmosetaap gedaan te worden. Op dit moment zijn er geen in vitro modellen (zoals cellijnen, organoïds) beschikbaar voor het marmoset model om de opname, bio-beschikbaarheid etc. van de nieuwe middelen te onderzoeken.

Vermindering

Een farmacokinetiek of een dosis bepaling op relevante gedrags biomerkers zal worden gedaan met het minimumaantal dieren dat nodig is. In het algemeen kan een farmacokinetiek studie met drie tot vier dieren volstaan. Het leidt vooral tot vermindering van het aantal dieren in de daaropvolgende MPTP-studie. Zo is het bijvoorbeeld dan niet nodig om twee concentraties in een ziekte van Parkinson therapie-evaluatie studie te testen, omdat in de dosis bepaling al de optimale dosis is vastgesteld.

Verfijning

Er is veel geïnvesteerd in micro-methodes om zoveel mogelijk informatie te krijgen uit beperkte bloedvolume zodat de dieren niet hoeven te worden gesedeerd. Ook worden de dieren getraind om zo veel mogelijk vrijwillig mee te werken aan bijv. uitvangprocedures, bloedafnames of toedieningen. De dieren worden altijd sociaal gehouden in een voor de marmoset geschikte, verrijkte omgeving.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Training: De dieren worden voor aanvang van de studie getraind om in de thuiskooi op de weegschaal te gaan staan, waardoor de stress van uitvangen wordt voorkomen. De dieren worden getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan invasieve biotechnische handelingen zoals het geven van een verdoving of kleine bloedafnames.

Welzijn: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en ervaren dierverzorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag, eetlust, of ontlasting, dan wordt de veterinair hiervan direct op de hoogte gesteld. Door trainen van dieren en het zoveel mogelijk gebruik maken van micro-methodes voor analyses waardoor weinig bloed nodig is wordt sedatie waar mogelijk vermeden.

Dit project wordt uitgevoerd binnen de huidige wet en regelgeving. Er zijn geen milieueffecten te verwachten. Indien er met toxische stoffen wordt gewerkt zal de betreffende regelgeving worden gehanteerd waardoor de veiligheidsvoorzieningen zorgvuldig gehanteerd worden met een adequaat afvalbeheer.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Niet van toepassing.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

X Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

X Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

X Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

X Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

In principe wordt er geen pijn verwacht. De toediening van een teststof kan, afhankelijk van de toedieningsroute, lokale pijn en irritatie veroorzaken. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. ongerief door toediening teststof
2. ongerief door sedatie en ontwaken uit sedatie
3. ongerief door herhaald bloedafname

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. De toediening van een teststof kan, afhankelijk van de toedieningsroute, lokale pijn en irritatie veroorzaken.
2. Voor sedatie moet het dier nuchter blijven. Ook het ontwaken uit sedatie kan vervelend zijn alsmede de temperatuurverlaging tijdens sedatie.
3. Het uitvangen en hanteren voor een zogenaamde vingerprik voor een kleine hoeveelheid bloed in het ongesedeerde dier kan stress veroorzaken. Grotere hoeveelheden bloed worden onder sedatie afgenomen (zie punt 2 hierboven).

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

1. Alle dieren worden intensief getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast. Intracraniale toediening vindt plaats onder algehele verdoving.
2. Dieren liggen tijdens het bijkomen uit de sedatie op een warmtemat ter voorkoming van temperatuurverlaging.
3. Door trainen van dieren en het zo veel mogelijk gebruik maken van micro-methodes voor analyses waardoor weinig bloed nodig is wordt sedatie waar mogelijk vermeden.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Over het algemeen zijn er geen ernstige effecten te verwachten bij een farmacokinetiek en dosisbepaling. In geval een dier onverwacht ernstig ziek wordt en niet behandeld kan worden, dan zal dit als eindpunt gelden en wordt het dier gedood. In dat geval zal het ongerief maximaal matig zijn.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Uit eerdere studies is dit nog niet eerder voorgevallen, daarom verwachten wij dat het percentage onder de 1 % zal liggen.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van *'terminaal', 'licht', 'matig'* of *'ernstig'* ongerief.

Het cumulatieve ongerief wordt geclassificeerd als matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee

X Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Alleen in de studies waarbij de biologische respons van de teststof op de hersenen en mogelijk andere organen onderzocht moet worden zullen de dieren aan het eind van een studie worden gedood. Geschat wordt dat dit om één studie binnen 5 jaar gaat.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 2 Type dierproef: Therapie evaluatie in het marmoset MPTP-model.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Dit project omvat het translationeel gebruik van een gevalideerd diermodel voor de ziekte van Parkinson, namelijk het MPTP-model in de common marmoset (*Callithrix jacchus*, het penseelaapje). Voor de MPTP-studies gaan wij uit van de opzet en model zoals gebruikt in eerdere succesvol verlopen MPTP-studies [1-5].

Bij de dieren wordt de ziekte van Parkinson geïnduceerd met MPTP. Daarbij zal in een of meerdere groepen dieren de experimentele behandeling worden toegediend en in een groep dieren een controle behandeling. Afhankelijk van de vraagstelling wordt gestart met de behandeling (therapie en controle) voor, tijdens of na de ziekte-inductie met MPTP. MPTP wordt subcutaan geïnjecteerd in een huidplooi van de buikwand. De ziekte-inductie bestaat uit meerdere injecties van MPTP (0,5-2 mg/kg). Afhankelijk van het inductieprotocol zal MPTP binnen een periode van 2 weken worden toegediend (maximale cumulatieve dosis van 9 mg/kg; subacute model) of gedurende 2-12 weken (maximale cumulatieve dosis van 12 mg/kg; chronisch progressief model).

De primaire uitkomstparameter is de mate van het optreden van klinische symptomen zoals immobiliteit, apathie, tremoren en stijfheid, of het optreden van de dyskinesie in armen, benen of romp. De verschillende verschijnselen worden gescoord op een schaal van 0 (niet aanwezig), 1 (wel aanwezig in hele milde vorm en normaal voor het specifieke dier), 2 (aanwezig in een milde vorm), 3 (aanwezig in een heftigere vorm dan mild maar minder heftig dan ernstig) tot 4 (ernstig aanwezig). Het betreft objectieve, betrouwbare en gestandaardiseerde systematische observaties die een goede maat vormen voor de ziekteprogressie en de mate van dyskinesia. Deze klinische symptomen worden dagelijks gemonitord tijdens de ziekte inductie en later minstens driemaal per week. Daarnaast worden er als secundaire uitkomstparameters ook andere gedragsparameters voor bijvoorbeeld motorische functies of cognitie gemeten met behulp van gedragsopstellingen. Voor de marmosetaap zijn diverse niet-invasieve gedragstesten ontwikkeld waarbij

motor gerelateerde functies gekwantificeerd kunnen worden. Deze taken kunnen op een standaard manier worden uitgevoerd zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Voorbeelden van enkele gevalideerde testen zijn: De 'Bungalow test' voor exploratief locomotor activiteit. De dieren kunnen zich vrij bewegen in een opstelling bestaande uit vier compartimenten die allen met elkaar verbonden zijn. Het aantal wisselingen van compartiment wordt als een maat voor activiteit in deze opstelling genomen [1-5]. De Toren klimtest voor het testen van het spring gedrag en activiteit. Deze bestaat uit een hoge kast met een transparante voorzijde. In de kast bevinden zich horizontale stokken waar de aap op kan springen zoals in een boom. In deze opstelling maken we gebruik van de natuurlijke motivatie van marmosetapen om in bomen te klimmen. De afstand tussen de stokken neemt toe (en dus wordt het springen moeilijker) naarmate ze hoger gepositioneerd zijn [1,4,6]. De 'Hourglass test' voor het meten van de opricht-reflex en het kunnen bewegen (akinesia). Deze test bestaat uit een koker voor marmosets die 180 graden wordt gedraaid waardoor de aap ondersteboven komt te staan. De tijd die nodig is om de positie te herstellen wordt geregistreerd [1,4,6]. De hand-oog coördinatie test waarbij het aapje een marshmallow beloning van een bewegende robotarm moet afhalen. Uniek voor de aap is het overeenkomstige handgebruik voor grijpen zoals bij de mens. De robot beweegt met verschillende snelheden [1,2,4,5]. CANTAB voor cognitie waarbij de aap met behulp van een touchscreen verschillende taken kan uitoefenen vanuit zijn thuiskooi, zoals visuele discriminatie (keuze maken uit twee symbolen) of delayed-match-to-sample waarbij de aap moet herinneren welk symbool eerst was gepresenteerd en daarna deze moet kiezen uit meerdere gepresenteerde symbolen. Voor veel van de cognitietaken is de prefrontale cortex van belang die vooral bij mensen en apen goed ontwikkeld is.
Voor de ziekte inductie worden de dieren eerst gehabitueerd aan gedragsopstellingen en daar waar nodig (bijvoorbeeld bij een leertaak zoals de hand-oog coördinatie taak) getraind. Van alle gedragstaken worden basiswaarden gemeten van het, dan nog, naïeve dier. Tijdens en na ziekte inductie worden deze gedragstaken herhaald uitgevoerd om het verloop (progressie) van de ziekte te kunnen volgen en het effect van een behandeling te kunnen meten.

Indien de onderzoeksvraag gericht is op het voorkomen of verminderen van dyskinesie (ongecontroleerde onwillekeurige bewegingen), wat optreedt als gevolg van de huidige therapie met Levodopa (L-DOPA) bij de ziekte van Parkinson, dan wordt naast de MPTP ook tweemaal dagelijks L-DOPA oraal toegediend. Na een toedieningsperiode van tenminste 3 weken zal de L-DOPA geïnduceerde dyskinesie optreden. De dyskinesie treedt alleen op in dieren met parkinsonisme, dus in MPTP behandelde dieren. Tijdens of na het induceren van dyskinesie met behulp van herhaalde L-DOPA toedieningen kunnen anti-dyskinesie middelen getest worden. Dyskinesie wordt gescoord op basis van het optreden van onwillekeurige bewegingen van armen, benen of romp en gelaatsuitdrukkingen zoals hierboven beschreven staat.

Verder wordt post-mortem de ernst van de pathologie in de hersenen onderzocht. Deze wordt bepaald door histologische kwantificatie van functionerende dopamine producerende cellen in de substantia nigra.

<u>Andere parameters kunnen zijn</u>:

1. Verlies van lichaamsgewicht
2. Afwijkende hematologie en bloedchemie
3. Verlies van motorfunctie gemeten met diverse gedragstesten
4. Slaapstoornis als gevolg van de ziekte van Parkinson middels elektro-encefalogram (EEG) en/of een actimeter.
5. Positron emission tomography (PET)- scan in het gesedeerde dier om de hoeveelheid aanwezige dopamine in de hersenen te meten. Hiervoor wordt radioactieve label, zoals bijvoorbeeld [^{18}F]6-fluoro-DOPA (F-DOPA), ingespoten wat het dopamine in de hersenen labelt en hierdoor zichtbaar wordt.

10.2.g

10.2.g

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

- Vóór de inductie van de ziekte van Parkinson wordt er bloed afgenomen voor het bepalen van individuele nul waarden. Na ziekte inductie zal enkele malen bloed worden afgenomen voor het bepalen van een veranderd bloedbeeld. Kleine bloedafnames worden bij ongesedeerde dieren afgenomen en grote bloedafnames worden uitgevoerd onder sedatie. Er zal nooit meer dan 0,7% van het lichaamsgewicht aan bloed per keer worden afgenomen en nooit meer dan 1% binnen een tijdspanne van 4 weken.
- Bij de dieren wordt de ziekte van Parkinson geïnduceerd door herhaalde subcutane injecties van MPTP in een huidplooi van de buikwand. Afhankelijk van het protocol worden herhaalde injecties (5-10) binnen 2 weken toegediend (subacuut protocol) of 1-2 injecties per week gedurende 2-12 weken (chronisch progressief protocol). Om dyskinesie te induceren krijgen de dieren na de MPTP-toedieningen tweedaags L-DOPA oraal toegediend. Dit is een standaardmethode voor de inductie van dyskinesie. Een studie duurt tussen de 6 weken en 6 maanden.
- Aangezien bij neurologische aandoeningen de hersenactiviteit kan veranderen, is de hersenactiviteit (gemeten met electroencephalogram (EEG)) een parameter om de ziekte inductie en het effect van de therapie hierop te kunnen meten. Voor het meten van het EEG, o.a. voor slaapanalyses, worden 3-4 weken voor aanvang van de studie onder algehele narcose, door het veterinaire team onder aseptische omstandigheden in de daarvoor ingerichte operatiekamer, een implanteerbare transmitter, voor telemetrische data acquisitie, met elektroden in de buikholte gebracht. De EEG-elektroden worden in de schedel geplaatst en de EMG-elektroden voor spierspanning in spierweefsel van de nek en schouder (t.b.v. het identificeren van de droom(REM)-slaap). Gedurende 3 dagen na de operatie krijgen de dieren pijnstilling om eventuele pijn ervaringen als gevolg van de operatie tegen te gaan en antibiotica 1 dag voorafgaand aan de operatie en enkele dagen erna.
- Voor bloedafname of toediening van MPTP of teststof of controle preparaat en gelijktijdige bepaling van het lichaamsgewicht worden de dieren uitgevangen. Zij worden voor aanvang van het experiment voor deze methode getraind. Daarnaast worden ze regelmatig gewogen in de thuiskooi (vrijwillig na training).
- De klinische score behorend bij de ziekte van Parkinson wordt dagelijks gemonitord via observaties om de progressie van het ziekteverloop te kunnen volgen.
- Gedragstesten (voor en na ziekte inductie en tijdens of na toediening van een behandeling). Voor aanvang worden de dieren gehabitueerd aan de gedragsopstellingen en worden basiswaarden gemeten.
- De toedieningsroute van teststof of controle preparaat wordt per studie bepaald en is afhankelijk van de aard van de teststof. Afhankelijk van de toedieningsroute zal de teststof of controle preparaat eenmalig of herhaaldelijk worden gegeven. Wanneer de toediening zal starten is afhankelijk van de teststof en de vraagstelling, bijvoorbeeld een of meerdere dagen voor de inductie, tegelijk met de inductie of na de inductie van de ziekte. Mogelijke toedieningsroutes zijn intraveneus (i.v.), subcutaan (s.c), intramusculaire (i.m.), intranasaal (i.n.), oraal (p.o), of intracraniaal (i.c.). Een eenmalige i.c. toediening wordt alleen toegepast als een teststof lokaal moet worden toegediend omdat het in de huidige

samenstelling niet door de bloed-hersen barrière kan om het werkingsmechanisme van de stof te testen. Wanneer mogelijk zal toediening zonder sedatie worden uitgevoerd om het dier het ongerief van sedatie te besparen.

- Om in een vroeg stadium de veranderingen in de hersenen te kunnen meten, wordt gebruik gemaakt van een PET-scan voor het meten van de hoeveelheid dopamine of de dopaminereceptor dichtheid. Hiervoor wordt een radioactieve ligand ingespoten dat bindt aan dopamine of zijn receptor, waardoor deze zichtbaar gemaakt worden in de scan. Dit wordt onder algehele narcose uitgevoerd.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Iedere studie zal worden uitgevoerd met een geschat aantal van 7 marmosetapen per groep (7 controledieren en 7 dieren per experimentele groep). Dit is afhankelijk van de te testen therapie en de statistische poweranalyse. Uit resultaten van eerdere studies is gebleken dat het gebruik van 6-7 dieren per groep betrouwbare resultaten oplevert. Het voor een experiment benodigde aantal dieren zal worden bepaald door middel van power-analyse gebaseerd op een eenvoudige t-test tussen groepen. De klinische gedragsscore wordt geselecteerd als primaire uitlees parameter. Afhankelijk van het inductie protocol wordt de standaarddeviatie (SD) en de effect size (ES) van de klinische gedragsscore geschat, op basis van eerdere studies, waarmee het aantal dieren (N) berekend kan worden. De berekening gaat uit van een normale verdeling. Om het aantal aan te passen naar een student-t verdeling wordt de N verhoogd met een voor iedere groep (dus N + 1/groep).
Er wordt altijd een positieve controlegroep meegenomen waarbij ook de ziekte van Parkinson wordt geïnduceerd maar zonder verdere behandeling. De effecten worden vergeleken tussen behandelde en onbehandelde (controle) groep. Er worden zoveel mogelijk parameters binnen een dier gemeten en deze worden dan vergeleken met hun eigen basiswaarden. Indien de basiswaarden sterk verschillen tussen de groepen dan wordt de verandering t.o.v. hun eigen basiswaarde als meetresultaat genomen zodat de variatie beperkt blijft. In sommige studies is het nodig om ook een naïeve groep (negatieve controlegroep waarbij geen ziekte van Parkinson wordt geïnduceerd) mee te nemen om de neuronale effecten (zoals bijvoorbeeld neurogenese en eiwit analyse of transcriptomics) op de hersenen te kunnen vergelijken met de gezonde situatie (post-mortem pathologische waardes kunnen slechts eenmaal per dier worden onderzocht). Deze dieren volgen verder wel het hele proces zodat de invloed van de handelingen kunnen worden uitgesloten. Voor de standaard histologie van schade aan de substantia nigra en bij studies waarbij de toegepaste handelingen en trainingen geen invloed hebben op de activiteit van de hersenen, wordt gebruik gemaakt van hersenmateriaal uit de hersenbank.

Variabelen zijn de verwachte klinische symptomen en motorische beperking en het verwachte effect van de behandeling.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Common marmoset (*Callithrix jacchus*), volwassen (> 2 jaar), M/V, uit de eigen fokkolonie, n=105.

Geschatte aantal studies is 6. Een studie zal worden uitgevoerd met een geschat aantal van 7 marmosets per groep en 2 tot 3 groepen per studie. Geschat wordt dat de helft van de studies uit 2 groepen zal bestaan. ((3 studies x 2 groepen + 3 studies x 3 groepen) x 7 dieren = (6+9) x 7= 105 dieren).

Het gebruik van de marmoset voor het testen van een nieuwe therapie voor de ziekte van Parkinson is essentieel om een aantal redenen:

- Bij het MPTP marmoset-model wordt schade aan de substantia nigra geïnduceerd waardoor Parkinsonverschijnselen optreden. Het MPTP-model kan behalve in de primaat ook in de kat en in de muis worden toegepast. De rat is ongevoelig voor MPTP, waardoor men in de rat gebruik maakt van het minder selectieve 6-OHDA-model;
- In het marmoset MPTP-model kan de progressie van het klinische beeld in tijd gevolgd worden. Hierdoor kan het effect van een behandeling over een lang termijn worden gemeten. Bij de kat verdwijnen spontaan de klinische symptomen en bij knaagdieren gebeurt dit zelfs al binnen twee dagen;
- Preklinische symptomen zoals verstoorde slaap bij de mens zijn ook waargenomen bij de marmosetaap

maar niet in knaagdieren. Dit is van belang voor het testen van behandelingen die ingrijpen op de vroege fase van het ziekteproces;

- De door L-DOPA optredende bijwerkingen van ongecontroleerde bewegingen, dyskinesia, treedt op een identieke wijze op in de marmosetaap. Bij knaagdieren is dit niet het geval;
- Het striatum, dat samen met de substantia nigra betrokken is bij de beweging-coördinatie, bestaat -net zoals bij de mens- uit meerdere structuren. In knaagdieren is dit slechts een enkelvoudige structuur zonder onderscheid tussen het putamen en de caudate nucleus.
- De marmoset is vanwege zijn hanteerbaarheid geschikt voor gedragsonderzoek om klinisch relevante gedragstaken te testen. Voorbeelden van test methodes die speciaal voor de marmosetaap zijn ontwikkeld: hand-oog coördinatie taak, locomotor activiteit, 24-uurs activiteit voor het circadiane ritme, opricht reflex, spring activiteit voor akinesia (niet kunnen starten van een beweging), cognitie met behulp van een 'touch screen' computertaak, slaap gedrag met behulp van telemetrische hersenactiviteit registratie. Veel van deze taken kunnen bij sociaal gehuisveste marmosetapen, vanuit de thuiskooi, uitgevoerd worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☐ Nee, ga door met vraag D.

X Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1e van de Wet op de Dierproeven. Van belang is wel dat er géén eerdere ingrepen hebben plaatsgevonden met een blijvend effect die het gedrag of de motorfunctie beïnvloedt of die een invloed hebben op het functioneren van de hersenen.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

X Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging

Door *in vitro* testen wordt een preselectie van effectieve geneesmiddelen gemaakt waardoor er zo min mogelijk dieren nodig zijn. Het nadeel van *in vitro* methoden is dat er geen interactie is met andere cellen en hersengebieden. Hiermee kan alleen het effect op een mechanisme in een cel getest worden en niet op de ziekte van Parkinson. Om de verstoorde interacties tussen hersengebieden te testen zijn we nog steeds afhankelijk van diermodellen.

De ziekte van Parkinson wordt veroorzaakt door schade in de hersenen leidend tot een verlies van motorfunctie. De verstoring van de interactie tussen verschillende hersengebieden resulteert in de gedragsveranderingen. Met de huidige stand van de proefdiervrije alternatieven is het niet mogelijk deze complexe interactie en het effect van een behandeling op het gedrag buiten het levende dier te bestuderen.

Het MPTP-inductie model voor de ziekte van Parkinson kan worden toegepast in verschillende diermodellen zoals de muis, de kat en de aap. Echter bij de kat verdwijnen spontaan de klinische symptomen en bij knaagdieren gebeurt dit zelfs al binnen twee dagen waardoor in deze diersoorten alleen post-mortem het effect kan worden aangetoond. Ook zijn vroege premotorische symptomen zoals verstoorde slaap alleen waargenomen bij de marmosetaap en niet in knaagdieren. Dit is van belang voor het testen van behandelingen die ingrijpen op het vroege ziekteproces. Doordat de klinisch relevante Parkinson-symptomen niet spontaan verdwijnen in het marmoset MPTP-model, is de marmoset geschikt om de progressie van het klinische beeld in tijd te volgen en belangrijk voor de voorspelling van de effecten van een behandeling in de kliniek.

Vermindering
Voordat een behandeling in apen wordt getest is het uitgebreid getest in het laboratorium en/of in andere diersoorten, bijvoorbeeld in muizen. Hieruit moet zijn gebleken dat de behandeling veilig is en dat er voldoende aanwijzingen zijn dat het werkzaam kan zijn. Uit dat onderzoek worden behandelingen geselecteerd voor verder onderzoek in apen om de vertaalslag naar de mens te vergroten. Het aantal benodigde dieren wordt per experiment bepaald aan de hand van statische analyses middels power-analyse. Het minimaal aantal benodigde dieren zal worden gebruikt. Dit aantal zal afhangen van de eigenschappen van de behandeling en van het te gebruiken ziekte-inductie protocol voor de ziekte van Parkinson. Om het aantal dieren te verminderen wordt van tevoren het gedrag van elk dier gemeten waardoor er een preselectie kan plaatsvinden zodat er minder uitval verwacht wordt en daardoor minder dieren nodig zijn voor de studie. De gedragsveranderingen na ziekte inductie en na behandeling worden tevens met de eigen oorspronkelijke performance (nul waarden) vergeleken. Bovendien leidt het uitvoeren van meerdere gedragstesten in hetzelfde dier tot vermindering van het aantal proefdieren. Tevens zijn door de voorafgaande PK en dosisbepaling-studie minder testgroepen nodig voor het testen van de effectiviteit waardoor het aantal dieren kan worden verminderd.

Verfijning
Voor de marmosetaap zijn diverse niet-invasieve gedragstesten ontwikkeld waarbij motor gerelateerde functies gekwantificeerd kunnen worden. Deze taken kunnen op een standaard manier worden uitgevoerd zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Een deel van deze testen kunnen plaatsvinden in de thuiskooi. Een voorbeeld is de 24-uurs activiteit in de thuiskooi middels een kleine draagbare actimeter die aan de halsketting voor identificatie wordt bevestigd. Alle testen worden uitgevoerd met behulp van spontane motivatie gebruikmakend van de voorkeur van de aap, zoals de klimtoren, of met gebruikmaking van voedsel beloning bij de hand-oog coördinatie test. De apen worden eerst 'gehabitueerd' aan de opstelling en daarna stapsgewijs voor de taak getraind. Doordat er diverse gedragstesten op hetzelfde dier worden uitgevoerd, is een nauwkeurigere meting van het effect van het kandidaat medicijn mogelijk. Dit lijdt tot verfijning en draagt tevens bij tot een nauwkeuriger bepaling van humane eindpunten. In geval van metingen van de hersenactiviteit (EEG), voor bijvoorbeeld slaap, wordt gebruik gemaakt van een telemetrisch systeem waardoor de aap zonder fixatie vrij kan bewegen in de thuiskooi. De procedure voor het aanbrengen van EEG-elektrodes is in eerdere studies verfijnd, waardoor de uitval van dieren door technische problemen sterk verminderd is (Bakker et al., (2014) Recovery time after intra-abdominal transmitter placement for telemetric (neuro) physiological measurement in freely moving common marmosets (*Callitrix jacchus*), Animal Biotelemetry 20142:10).

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Training: De dieren worden voor aanvang van de studie getraind om in de thuiskooi op de weegschaal te gaan staan, waardoor de stress van uitvangen wordt voorkomen. De dieren worden getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan invasieve biotechnische handelingen zoals het geven van een verdoving of kleine bloedafnames. Verder worden de dieren eerst gehabitueerd aan de gedragsopstellingen zodat ze op een vertrouwde wijze de gedragstaken kunnen uitvoeren en daar waar nodig getraind (bijvoorbeeld bij een leertaak zoals de hand-oog coördinatie taak of cognitietaak).

Welzijn: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente dierverzorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag anders dan de Parkinson-symptomen, eetlust, of ontlasting, dan wordt de veterinair hiervan op de hoogte gesteld.

Er zijn geen nadelige milieueffecten te verwachten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Niet van toepassing.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

X Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

X Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

X Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

X Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

De typische ziekte van Parkinson symptomen bij de mens induceren geen pijn. Wel ondervinden patiënten last van de verminderde controle over hun motorfuncties. Wanneer symptomen van pijn worden geobserveerd zal orale of parenterale pijnstilling worden toegediend na overleg met de veterinair. Het aanbrengen van de elektroden voor het meten van het EEG of het maken van een gaatje in de schedel voor intracraniale toediening vindt plaats onder algehele narcose gevolgd door pijnstilling om eventuele pijn ervaringen tegen te gaan.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. ongerief door toediening van injectie
2. ongerief door sedatie en ontwaken uit sedatie
3. ongerief door klinische Parkinson-symptomen
4. single huisvesting indien noodzakelijk
5. ongerief door bloedafname

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. De subcutane inspuiting kan irritatie geven.
2. Voor sedatie moet het dier nuchter blijven. Ook het ontwaken uit anesthesie kan vervelend zijn alsmede de temperatuurverlaging tijdens sedatie.
3. Parkinsonisme leidt tot symptomen als apathie, mindere bewegelijkheid, tremoren en stijfheid. Het verlies van motor functies kan als stressvol worden ervaren. In ons MPTP-model is het weleens voorgekomen (bij 4% van de dieren) dat de dieren enkele dagen een beweging niet kunnen stoppen waardoor ze vastlopen in een hoek van de kooi. Hierdoor kan de huid geïrriteerd raken aan het draadwerk. Indien dat optreedt worden de hoeken van de kooi voorzien van zachte stootbanden zoals opgerolde handdoeken waardoor ze zich niet aan het metaal kunnen verwonden. Het is onze ervaring dat deze directe effecten van het MPTP na enkele dagen verdwenen zijn.
4. Tijdens de studie worden de dieren sociaal gehuisvest. Het kan voorkomen dat een kooigenoot vroegtijdig overlijdt waardoor de ander alleen komt te zitten. marmosets zijn sociale dieren en alleen gehuisvest zitten kan stress geven.
5. Het uitvangen en hanteren voor een zogenaamde vingerprik voor een kleine hoeveelheid bloed in het ongesedeerde dier kan stress veroorzaken. Grotere hoeveelheden bloed worden onder sedatie afgenomen (zie punt 2 hierboven).

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

1. Alle dieren worden intensief getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.
2. Dieren liggen op een warmtemat ter voorkoming van temperatuurverlaging
3. Wanneer motorische effecten worden waargenomen, zoals het niet stoppen van een beweging waardoor ze vastlopen, zal de kooi aangepast worden door het aanbrengen van doeken in de hoeken van de kooi. Dit om te voorkomen dat ze zich aan het gaas van de kooi verwonden. We werken met een cumulatieve discomfort schaal van de klinische symptomen. Dieren worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.
4. Als een dier door omstandigheden (zoals het bereiken van humaan eindpunt van een kooigenoot) gedurende de studie individueel komt te zitten, wordt er geen nieuwe partner geïntroduceerd omdat dit meer stress oplevert dan individuele huisvesting voor de resterende tijd van een studie.
5. De dieren worden intensief getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van de bloedafname plek zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Indien een dier ernstig gewichtsverlies (>15% van het lichaamsgewicht), of ziekteverschijnselen (zoals braken of diarree) gaat vertonen zal in overleg met de veterinair worden besloten of behandeling nodig is of dat het dier uit de studie gehaald wordt. In geval van ernstige ziekteverschijnselen zal een dier direct uit studie worden genomen en geëuthanaseerd (gevolgd door uitgebreide sectie) om verder ongerief te voorkomen. Dit vindt plaats wanneer het eindpunt volgens de klinische score* is bereikt waarbij de maximale gemiddelde cumulatieve score >3,5 is voor tenminste twee dagen, of wanneer het algemene welzijn door andere omstandigheden ernstig wordt aangetast. Anders worden de dieren geeuthaniseerd op het eindpunt van de studie. De humane eindpunten voorkomen dat matig ongerief ernstig wordt en daarom is er geen ernstig ongerief in deze dierproef.

* De klinische score is zowel belangrijk als uitkomstparameter tijdens de studie als voor het bepalen van het humane eindpunt. Klinische score omvat o.a. verminderd vachtonderhoud (poetsgedrag), apathie

6

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD5020020172687

2. Titel van het project: Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson

3. Titel van de NTS: Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson

4. Type aanvraag:
   - ✓ nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC: 10.2.g
   - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e
   - e-mailadres contactpersoon:

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ✓ ontvangen door DEC: 20-07-2017
   - ✓ aanvraag compleet: 20-07-2017
   - ✓ in vergadering besproken: 02-08-2017 en 24-08-2017 en 06-09-2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - ✓ termijnonderbreking(en) van 04-08-2017 tot 17-08-2017, 28-08-2017 tot 01-09-2017
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ✓ aanpassing aanvraag: 17-08-2017, 01-09-2017 en 07-09-2017
   - ✓ advies aan CCD: 11-09-2017

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
   De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend bij de DEC.

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

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
   - Datum: 06-09-2017
   - Plaats: Rijswijk
   - Aantal aanwezige DEC-leden: vijf
   - Aanwezige (namens) aanvrager: de verantwoordelijke onderzoeker
   - Gestelde vraag / vragen: Nadere uitleg werd gevraagd over de in bijlage 1 Sectie A beschreven farmacokinetiek en dosis bepaling studies. De samenhang tussen deze studies was niet geheel duidelijk.
   - Verstrekt(e) antwoord(en): De samenhang tussen deze onderdelen werd uitgelegd.
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: In bijlage 1 is sectie A overeenkomstig aangepast.

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum: 04-08-2017, 28-08-2017, 06-09-2016
   - Gestelde vraag/vragen: Enige tekstuele aanpassingen, aanvullende informatie betreffende het marmoset MPTP model, de positionering van dit model ten opzichte van alternatieve beschikbare diermodellen en binnen het ontwikkelings traject van nieuwe therapieën tegen de ziekte van Parkinson. Tevens werd gevraagd naar de mogelijkheid om physiologically based pharmacokinetic modelling toe te passen en om aanvullende informatie over biotechnische handelingen, milieueffecten, verfijning en humane eindpunten.
   - Datum antwoord: 17-08-2017, 01-09-2017, 07-09-2017
   - Verstrekt(e) antwoord(en): Het project is aangepast in het format projectvoorstel dierproeven (nadere beschrijving van het MPTP model, vergelijk met andere diermodellen, inbedding van het onderzoek binnen het ontwikkelingstraject voor nieuwe geneesmiddelen), in de bijlages is extra informatie opgenomen betreffende de biotechnische handelingen, milieueffecten, verfijning en humane eindpunten. Physiologically based pharmacokinetic modelling kan niet worden toegepast aangezien het bij de in bijlage 1 beschreven experimenten niet zozeer gaat om kinetiek studies, maar om het vaststellen van de juiste dosis en het tijdstip voor het maximale effect.
   - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC). N.v.t.
    - Aard expertise
    - Deskundigheid expert
    - Datum verzoek
    - Strekking van het verzoek
    - Datum expert advies
    - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is <u>vergunningplichtig</u>.

2. De aanvraag betreft een <u>nieuwe aanvraag</u>.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen onderzoek naar neurologische aandoeningen, statistische analyse, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming. De DEC heeft ruime ervaring met het beoordelen van de modellen die gebruikt worden voor screenen en evalueren van nieuwe therapieën tegen de ziekte van Parkinson in het marmoset MPTP model.

4. **Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.** Er waren geen conflicterende belangen bij de beoordeling van dit voorstel

C. Beoordeling (inhoud)

1. **Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.** Het voorgestelde onderzoek bestaat uit twee onderdelen, te weten 1) bepaling van de dosis waarin de potentieel nieuwe therapieën getest moeten gaan worden en het effect op relevante biomerkers en 2) *in vivo* evaluatie van de effectiviteit van potentieel nieuwe therapieën tegen de ziekte van Parkinson of tegen door L-DOPA veroorzaakte bijwerkingen. De subdoelen sluiten logisch aan bij het hoofddoel en vormen een samenhangend geheel en zijn noodzakelijk om het hoofddoel te bereiken. De te testen potentiele therapieën zijn veelal ontwikkeld op basis van wetenschappelijke inzichten in mogelijke werkingsmechanismen en specifieke aangrijpingspunten.

2. **Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).** Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. **Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.** De aangegeven doelcategorie, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek', sluit aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag worden nieuwe potentiele therapieën tegen de ziekte van Parkinson *in vivo* onderzocht op hun therapeutisch effect tegen de verschijnselen van de ziekte van Parkinson en tegen de bijwerkingen van L-DOPA, tot nu toe het meest effectieve middel tegen de verschijnselen van de ziekte van Parkinson.

Belangen en waarden

4. **Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.** Het directe doel van het project is het screenen van nieuwe potentiele therapieën op activiteit tegen de ziekte van Parkinson en tegen de bijwerkingen van L-DOPA in een niet-humane primaten model waarin de symptomen van Parkinson zijn geïnduceerd door toediening van de neurotoxische stof MPTP. Het uiteindelijke doel is het bijdragen aan het beschikbaar komen van betere en bij voorkeur causale geneesmiddelen tegen de ziekte van Parkinson. Nieuwe geneesmiddelen tegen de ziekte van Parkinson zijn nodig omdat er slechts een beperkt aantal middelen beschikbaar zijn, welke niet afdoende helpen bij het stoppen van de ziekte. Het meest gebruikte medicijn, L-DOPA, veroorzaakt dyskinesie, onwillekeurige, ongecontroleerde, repeterende en soms stereotype bewegingen. Nieuwe middelen zullen worden getest op effectiviteit (ofwel remming van symptomen van de ziekte van Parkinson, ofwel remming van de bijwerkingen van L-DOPA) en reductie in pathologie (post-mortem). Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. **Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden** *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld).* De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van

een effectieve therapie tegen de ziekte van Parkinson zijn de te behandelen personen, de proefdieren en het onderzoeksveld.

Voor de te behandelen Parkinson patiënten is het beschikbaar komen van een effectief middel tegen de ziekte van Parkinson van groot belang, aangezien het meest gebruikte medicijn tegen deze ziekte niet zonder ernstige bijwerkingen langdurig gebruikt kan worden. Dit heeft een ernstig nadelig effect op het welzijn en functioneren van de patiënt. Alleen met het beschikbaar komen van nieuwe therapieën kan de ziekte van Parkinson beter behandeld worden.

Het belang voor de samenleving is dat Parkinson patiënten een betere behandeling kunnen krijgen. Hierdoor wordt de kwaliteit van leven verhoogd en het zal resulteren in een sterke verbetering van de gezondheid van grote groepen mensen, een sterke beperking van de uitgaven voor verpleging en medicatie en minder verlies in economische productiviteit doordat Parkinson patiënten langer deel kunnen blijven nemen aan het arbeidsproces.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen stress ondervinden, zullen verschijnselen van de ziekte van Parkinson gaan vertonen en soms enige mate van pijn ondervinden.

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s). Dit onderzoek kan leiden tot ontwikkeling van nieuwe klassen van anti-Parkinson geneesmiddelen en tot meer inzicht in de werkingsmechanismen van deze geneesmiddelen, alswel in het verloop van de ziekte.

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

Proefopzet en haalbaarheid

7. **Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.** De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn boven iedere twijfel verheven gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

8. **Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.** De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project. Wel zou naar de mening van de DEC additionele informatie verkregen kunnen worden door te zoeken naar vroege biomarkers die de ziekte van Parkinson kunnen voorspellen.

Welzijn dieren

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

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

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor inductie van sterk op de ziekte van Parkinson gelijkende verschijnselen bij marmoset apen en het feit dat het model chronisch is, waardoor het effect van potentiele therapieën op specifieke ziekte symptomen en het verloop van het ziekte bestudeerd kan worden, dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld knaagdiermodellen. De dosering van de kandidaat geneesmiddelen wordt bepaald aan de hand van beperkte PK/PD studies in gezonde dieren. De eventuele nadelige effecten van de kandidaat geneesmiddelen zullen ook deels naar voren kunnen komen.
Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.
De huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief is correct als matig ingeschat op basis van ervaring met PK studies en MPTP-geïnduceerde Parkinson studies in niet-humane primaten en wordt veroorzaakt door de experimentele technieken, de toegediende geneesmiddelen en de klinische symptomen ten gevolge van de ziekte (indien van toepassing). In combinatie zijn de gevolgen van deze handelingen terecht als matig ongerief ingeschat. Monitoren van klinische symptomen en gedragstesten zullen worden gebruikt om ongerief te scoren, dat niet boven een vastgesteld maximum zal uitkomen. De dieren zijn speciaal voor dit doel gefokt, en zullen als sociaal compatibel duo worden gehuisvest.

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 die voor PK/PD studie worden gebruikt wordt aangetast door de toediening van geneesmiddelen en frequente bloedafnames. Deze aantasting van de integriteit is van voorbijgaande aard en de dieren zullen in de meeste gevallen geheel terug keren naar hun oorspronkelijke toestand, qua gezondheid en welzijn. In sommige gevallen zullen de dieren aan het eind van de PK/PD studie gedood worden ten einde onderzoek te kunnen doen naar de biologische respons van de teststof. De integriteit van de dieren waarbij de effectiviteit van geneesmiddelen wordt getest wordt aangetast door de dieren te behandelen met MPTP waardoor symptomen van de ziekte van Parkinson zullen optreden alsmede door de toediening van L-DOPA en geneesmiddelen ofwel tegen de ziekte van Parkinson of tegen de bijwerkingen van L-DOPA. Door de symptomen van de ziekte van Parkinson zullen de dieren motorische en cognitieve beperkingen krijgen en niet volledig meer kunnen functioneren. Indien de gekozen behandeling effectief blijkt te zijn zal bij dit deel van de dieren de symptomen minder ernstig verlopen.

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 zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de kans dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken terecht als laag ingeschat.

14. **Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn.** In dit project worden potentiele nieuwe therapieën tegen de ziekte van Parkinson geëvalueerd op hun werkzaamheid in marmoset apen. Bij deze dieren kan door behandeling met MPTP een ziekte worden geïnduceerd die zeer veel overeenkomsten vertoont met de ziekte van Parkinson bij de mens, en ook de behandeling met L-DOPA geeft dezelfde bijwerkingen als bij mensen. Modellen voor de ziekte van Parkinson in andere dieren (muis, kat en rat) zijn wel beschreven maar komen minder overeen met de humane ziekte, zijn niet chronisch en ook de structuur van de hersenen en werking van geneesmiddelen is anders in andere diersoorten. Door de experimenten in niet-humane primaten kunnen inzichten in effectiviteit en mogelijke bijwerkingen naar voren komen die bij onderzoek met andere diersoorten gemist zouden zijn. Deze stap overslaan en direct onderzoek met menselijke vrijwilligers verrichten is in dit stadium van de ontwikkeling van de potentiele therapieën dan ook niet verantwoord.

15. **Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.** Het aantal dieren dat nodig is voor de PK studies wordt tot een minimum beperkt. Het aantal benodigde dieren voor de *in vivo* evaluatie van de effectiviteit van potentiele geneesmiddelen wordt bepaald met behulp van statische powerberekeningen op basis van gegevens uit voorgaande experimenten. Bij het onderzoeken van meerdere kandidaten geneesmiddelen binnen een proefopzet zal het aantal controlegroepen beperkt worden.

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 uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren die goed aan mensen gewend zijn, de dieren zijn bovendien getraind om zo veel mogelijk mee te werken aan bepaalde diertechnische handelingen, waardoor ze minder stress ervaren. Sedatie en pijnbestrijding zullen worden toegepast wanneer geïndiceerd. Bij onverwacht grotere welzijnsaantasting dan voorzien zal een humaan eindpunt worden toegepast, dat duidelijk gedefinieerd is. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

19. **Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood**

worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. De meeste dieren van de PK/PD studie zullen in leven blijven na afloop van het project, slechts in uitzonderingsgevallen (als men het effect van een middel op het brein of andere organen wil onderzoeken) zullen dieren worden gedood. De dieren die gebruikt worden om de effectiviteit van anti-Parkinson middelen te testen zullen worden gedood aan het einde van het traject omdat het effect van de te testen middelen op de pathologie van het brein moet worden beoordeeld.

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. Hergebruik zal plaats vinden binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke kwaliteit.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het evalueren van nieuwe potentiele therapieën tegen de ziekte van Parkinson het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, de aantasting van de integriteit en het doden van de dieren? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen.

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

   De waarde voor de te behandelen personen met de ziekte van Parkinson is gelegen in het mogelijk beschikbaar komen van effectieve therapieën die verergering van de ziekte kunnen voorkomen of de symptomen kunnen verminderen. Dit betekent een sterke verbetering van de kwaliteit van leven van de betrokken personen en verlichting voor de sociale omgeving. De voordelen voor de maatschappij zijn zowel economisch (jongere mensen met de ziekte van Parkinson kunnen langer aan het arbeidsproces blijven deelnemen, Parkinson patiënten in het algemeen zullen langer zelfstandig kunnen blijven, daardoor minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn van de samenleving (minder zieken, minder zorgkosten).

   Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze zullen ziek worden door de inductie van Parkinson en de door L-DOPA geïnduceerde symptomen en zullen door verminderd motorisch en cognitief functioneren hinder ondervinden. Ze kunnen enige pijn ondervinden door bloedafnames en injecties. De dieren ondervinden hiervan matig ongerief.

   De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de ontwikkeling

van de ziekte van Parkinson en werkingswijze van mogelijke behandelmethodes. Tevens wordt inzicht verkregen in de mogelijkheden om L-DOPA geïnduceerde bijwerking tegen te gaan.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van nieuwe therapieën waarmee mensen met de ziekte van Parkinson behandeld kunnen worden. De nieuwe medicijnen kunnen ofwel een alternatief vormen voor L-DOPA, waar ernstige bijwerkingen van bekend zijn, ofwel ze kunnen beschermen tegen de bijwerkingen van dit middel. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

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

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

Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat het ontwikkelen van een effectief medicijn tegen de verschijnselen van de ziekte van Parkinson voor veel mensen een aanzienlijke verbetering van de kwaliteit van leven geeft.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door het feit dat de gebruikte onderzoekmodellen al eerder gebruikt zijn door de onderzoeker. De onderzoeker en het instituut bezitten de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor het *in vivo* testen van de effectiviteit van potentiele therapieën, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De studie zal worden uitgevoerd in common marmosets (*Callithrix jacchus*). De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor inductie van Parkinson met MPTP en geschiktheid voor gedragstesten. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. In dit diermodel kunnen ook eventuele nadelige effecten aan het licht komen. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoort, de dieren zijn afkomstig uit eigen fok, de 3V-principes worden gehonoreerd door het toepassen van een klinische scoringstabel en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen (positive reinforcement). Het ongerief is maximaal matig. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
   - ✓ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
     - ✓ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.

7

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020172687

Bijlagen
2

Datum 13 september 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 12 september 2017. Het gaat om uw project "Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020172687. 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.

Datum:
13 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172687

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
13 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172687

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	50200
Naam instelling of organisatie:	Biomedical Primate Research Centre
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	10.2.e
KvK-nummer:	41146967
Straat en huisnummer:	Lange Kleiweg 161
Postbus:	3306
Postcode en plaats:	2288 GJ RIJSWIJK
IBAN:	10.2.g
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Stichting Biomedical Primate Research Centre

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
13 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172687

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

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 januari 2018
Geplande einddatum:	1 januari 2023
Titel project:	Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson
Titel niet-technische samenvatting:	Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson
Naam DEC:	10.2.g
Postadres DEC:	10.2.g
E-mailadres DEC:	10.2.e

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.287,-
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

Datum:
13 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172687

Ondertekening

Naam:	10.2.e
Functie:	10.2.g
Plaats:	Rijswijk
Datum:	12 september 2017

Centrale Commissie Dierproeven

8

Datum 26-09-2017
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20172687

Advies aan CCD

B

Instelling:	Biomedical Primate Research Centre
Onderzoeker:	10.2.e
Project:	Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson
Aanvraagnummer:	AVD20172687
Betreft:	Nieuwe aanvraag
Categoriën:	Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	11.1

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Bepaling van farmacakinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags blomerkers in gezonde marmosets.				
	Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus)	marmosets	32	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**
3.4.4.2 Therapie evaluatie in het marrnaset MPTP-model.				
	Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus)	marmosets	105	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**

De dieren worden in duo's gehuisvest, wanneer een kooigenoot in het kader van het experiment wordt geuthanaseerd, dan kan het gebeuren dat het andere dier individueel gehuisvest is gedurende de resterende looptijd van de dierproef. Dit omdat het introduceren van een nieuwe kooigenoot meer stress/ ongerief zal veroorzaken.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Bepaling van farmacakinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags blomerkers in gezonde marmosets. / Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.
- 3.4.4.2 Therapie evaluatie in het marrnaset MPTP-model. / Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	10.2.g
Maatschappij	11.1

2 DEC advies

DEC-advies	Enige tekstuele aanpassingen, aanvullende informatie betreffende het rnarmoset MPTP model, de positionering van dit model ten opzichte van alternatieve beschikbare diermodellen en binnen het ontwikkelings traject van nieuwe therapieën tegen de ziekte van Parkinson. Tevens werd gevraagd naar de mogelijkheid om physiologically based pharmacokinetic rnadelling toe te passen en om aanvullende informatie over biotechnische handelingen, milieueffecten, verfijning en humane eindpunten.

Ethische afweging van de DEC:
citaat: Rechtvaardigt het evalueren van nieuwe potentiële therapieën tegen de ziekte van Parkinson het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, de aantasting van de integriteit en het doden van de dieren? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen.
De waarde voor de te behandelen personen met de ziekte van Parkinson is gelegen in het mogelijk beschikbaar komen van effectieve therapieën die verergering van de ziekte kunnen voorkomen of de symptomen kunnen verminderen. Dit betekent een sterke verbetering van de kwaliteit van leven van de betrokken personen en verlichting voor de sociale omgeving. De voordelen voor de maatschappij zijn zowel economisch (jongere mensen met de ziekte van Parkinson kunnen langer aan het arbeidsproces blijven deelnemen Parkinson patiënten in het algemeen zullen langer zelfstandig kunnen blijven, daardoor minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn van de samenleving (minder zieken, minder zorgkosten).
Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze zullen ziek worden door de inductie van Parkinson en de door L-DOPA geïnduceerde symptomen en zullen door verminderd motorisch en cognitief functioneren hinder ondervinden. Ze kunnen enige pijn ondervinden door bloedafuames en injecties. De dieren ondervinden hiervan matig ongerief.
De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de ontwikkeling van de ziekte van Parkinson en werkingswijze van mogelijke behandelmethodes. Tevens wordt inzicht verkregen in de mogelijkheden om L-DOPA geïnduceerde bijwerking tegen te gaan.
Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van nieuwe therapieën waarmee mensen met de ziekte van Parkinson behandeld kunnen worden. De nieuwe medicijnen kunnen ofwel een alternatief vormen voor L-DOPA, waar ernstige bijwerkingen van bekend zijn, ofwel ze kunnen beschermen tegen de bijwerkingen van dit middel. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.
De DEC concludeert dat de belangen van de samenleving die worden nagestreefd in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.
Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat het ontwikkelen van een effectief medicijn tegen de verschijnselen van de ziekte van Parkinson voor veel mensen een aanzienlijke verbetering van de kwaliteit van leven geeft.

	De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door het feit dat de gebruikte onderzoekmodellen al eerder gebruikt zijn door de onderzoeker. De onderzoeker en het instituut bezitten de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor het in vivo testen van de effectiviteit van potentiele therapieën, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De studie zal worden uitgevoerd in common marmosets (Callithrixjacchus). De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor inductie van Parkinson met MPTP en geschiktheid voor gedragstesten. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. In dit diermodel kunnen ook eventuele nadelige effecten aan het licht komen. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoort, de dieren zijn afkomstig uit eigen fok, de 3Vprincipes worden gehonoreerd door het toepassen van een klinische scoringstabel en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen (positive reinforcement). Het ongerief is maximaal matig. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt. De DEC heeft extern advies ingewonnen bij - de aanvrager is om aanvullingen gevraagd Het DEC advies is Positief Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	11.1 .
	Er zijn geen DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid.
11.1	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	10.2.g [redacted]
Doelstelling Doelstelling	citaat: In dit project wordt de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes tegen de ziekte van Parkinson onderzocht in een diermodel voor deze ziekte, namelijk het MPTP-model in de marmosetaap. citaat: Het concrete doel van dit proiect is selectie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson voor verdere klinische studies. Het is de verwachting dat binnen de looptijd van dit project 6 nieuwe methoden onderzocht gaan worden. Het uiteindelijke doel van het onderzoek is dat therapieën beschikbaar komen waarmee de symptomen van de ziekte van Parkinson voor de patiënt worden verlicht en de verdere achteruitgang wordt verminderd of voorkomen.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	citaat: In Nederland leven ongeveer 32.000 mensen met de ziekte van Parkinson, dat is op dit moment 1 op de 500 mensen. Aangezien het een ouderdoms ziekte is, wordt er op korte termijn een verdubbeling verwacht vanwege de vergrijzende samenleving. De ziekte treft vooral ouderen vanaf 55 jaar, die nog lang een bijdrage aan de maatschappij hadden kunnen leveren. Voor de Parkinsonpatiënt betekent dit een verminderde kwaliteit van leven met ernstige incapacitatie van beweging en complicaties zoals ernstige depressie, slaapverstoring, cognitieve achteruitgang, constipatie en incontinentie. Aangezien deze patiënten aangewezen zijn op de hulp van anderen beïnvloedt deze ziekte ook hun directe omgeving. Naarmate de ziekte vordert is zelfstandig wonen niet meer mogelijk maar is intensieve begeleiding noodzakelijk. De huidige therapieën die ontwikkeld zijn tegen de ziekte van Parkinson onderdrukken slechts de symptomen. Aangezien de ziekte progressief is wordt de ernst van de symptomen alleen maar erger waardoor steeds meer medicatie nodig is voor hetzelfde effect. Hierdoor ontwikkelt zich tolerantie voor het medicijn en moet de patiënt tussendoor regelmatig overstappen op andere medicijnen. Tevens hebben de huidige therapieën veel bijwerkingen zoals hallucinaties en onwillekeurige ongecontroleerde bewegingen, die we dyskinesia noemen. Omdat de ziekte een ernstig verslechterend verloop heeft en de incidentie door de groeiende vergrijzing toeneemt, Is het belangrijk dat de ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen de ziekte van Parkinson blijft doorgaan. Het marmoset MPTP-model draagt daaraan bij door enerzijds het testen van de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes (maatschappelijk belang) maar anderzijds ook doordat onderzoek in het model informatie oplevert over het mechanisme wat ten grondslag ligt aan de ziekte (wetenschappelijk belang) en daarmee nieuwe aanknopingspunten voor behandeling gevonden kunnen worden. Bovendien kan met het onderzoek ook ongewenste nevenwerkingen van het medicijn worden ontdekt, zoals in eerdere studies met het marmoset MPTP model is gevonden. Deze informatie is van belang voor het verdere traject van de kandidaatsstof voor klinisch gebruik.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	11.1

3V's Vervanging	
	3.4.4.1 Bepaling van farmacakinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags blomerkers in gezonde marmosets.: citaat: In veel gevallen wordt een teststof door een externe partij aangeleverd om te testen in het MPTP-model. Een therapie kan meteen in het marrnaset MPTP-model getest worden als er uit eerdere in vitro of In vivo studles met knaagdieren een indicatie is voor een te testen concentratie en toedieningsschema. De hieruit vastgestelde gegevens kunnen worden gebruikt voor een indicatie voor de dosis en het tijdstip voor het optimale effect van de stof in de marmosetaap. Echter wanneer dit niet voldoende informatie oplevert voor een therapie evaluatie in het MPTP-model, dient er voorafgaand aan een therapie evaluatie (Bijlage 2) eerst een farmacakinetiek en/of dosisbepaling op relevante gedrags blomerkers in de gezonde marmosetaap gedaan te worden. Op dit moment zijn er geen in vitro modellen (zoals cellijnen, organoïds) beschikbaar voor het marmoset model om de opname, blo-beschikbaarheid etc. van de nieuwe middelen te onderzoeken.

	3.4.4.2 Therapie evaluatie in het marrnaset MPTP-model.: citaat: Door in vitro testen wordt een preselectie van effectieve geneesmiddelen gemaakt waardoor er zo min mogelijk dieren nodig zijn. Het nadeel van in vitro methoden is dat er geen interactie is met andere cellen en hersengebieden. Hiermee kan alleen het effect op een mechanisme in een cel getest worden en niet op de ziekte van Parkinson. Om de verstoorde interacties tussen hersengebieden te testen zijn we nog steeds afhankelijk van diermodellen. De ziekte van Parkinson wordt veroorzaakt door schade in de hersenen leidend tot een verlies van motorfunctie. De verstoring van de interactie tussen verschillende hersengebieden resulteert in de gedragsveranderingen. Met de huidige stand van de proefdiervrije alternatieven is het niet mogelijk deze complexe interactie en het effect van een behandeling op het gedrag buiten het levende dier te bestuderen. Het MPTP-inductie model voor de ziekte van Parkinson kan worden toegepast in verschillende diermodellen , zoals de muis, de kat en de aap. Echter bij de kat verdwijnen spontaan de klinische symptomen en bij knaagdieren gebeurt dit zelfs al binnen twee dagen waardoor in deze diersoorten alleen post-mortem het effect kan worden aangetoond. Ook zijn vroege premotorische symptomen zoals verstoorde slaap alleen waargenomen bij de marmosetaap en niet in knaagdieren. Dit is van belang voor het testen van behandelingen die ingrijpen op het vroege ziekteproces. Doordat de klinisch relevante Parkinsonsymptomen niet spontaan verdwijnen in het marmoset MPTP-model, is de marrnaset geschikt om de progressie van het klinische beeld in tijd te volgen en belangrijk voor de voorspelling van de effecten van een behandeling in de kliniek.

Verminderen	
	3.4.4.1 Bepaling van farmacakinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags blomerkers in gezonde marmosets.: citaat: Een farmacakinetiek of een dosis bepaling op relevante gedrags blomerkers zal worden gedaan met het minimumaantal dieren dat nodig is. In het algemeen kan een farmacakinetiek studie met drie tot vier dieren volstaan. Het leidt vooral tot vermindering van het aantal dieren in de daaropvolgende MPTP-studie. Zo is i het bijvoorbeeld dan niet nodig om twee concentraties in een ziekte van Parkinson therapie-evaluatie studie te testen, omdat in de dosis bepaling al de optimale dosis is vastgesteld.
	3.4.4.2 Therapie evaluatie in het marrnaset MPTP-model.: citaat: Voordat een behandeling in apen wordt getest is het uitgebreid getest in het laboratorium en/of in andere diersoorten, bijvoorbeeld in muizen. Hieruit moet zijn gebleken dat de behandeling veilig is en dat er voldoende aanwijzingen zijn dat het werkzaam kan zijn. Uit dat onderzoek worden behandelingen geselecteerd voor verder onderzoek in apen om de vertaalslag naar de mens te vergroten. Het aantal benodigde dieren wordt per experiment bepaald aan de hand van statische analyses middels power-analyse. Het minimaal aantal benodigde dieren zal worden gebruikt. Dit aantal zal afhangen van de eigenschappen van de behandeling en van het te gebruiken ziekte-inductie protocol voor de ziekte van Parkinson. Om het aantal dieren te verminderen wordt van tevoren het gedrag van elk dier gemeten waardoor er een preselectie kan plaatsvinden zodat er minder uitval verwacht wordt en daardoor minder dieren nodig zijn voor de studie. De gedragsveranderingen na ziekte inductie en na behandeling worden tevens met de eigen oorspronkelijke performance {nul waarden) vergeleken. Bovendien leidt het uitvoeren van meerdere gedragstesten In hetzelfde dier tot vermindering van het aantal proefdieren. Tevens zijn door de voorafgaande PK en dosisbepaling-studie minder testgroepen nodig voor het testen van de effectiviteit waardoor het aantal dieren kan worden verminderd.

Verfijnen	
	3.4.4.1 Bepaling van farmacakinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags blomerkers in gezonde marmosets.: citaat: Er is veel geïnvesteerd in micro-methodes om zoveel mogelijk informatie te krijgen uit beperkte bloedvolume zodat de dieren niet hoeven te worden gesedeerd. Ook worden de dieren getraind om zo veel mogelijk vrijwillig mee te werken aan bijv. uitvangprocedures, bloedafnames of toedieningen. De dieren 'worden altijd sociaal gehouden in een voor de marmoset geschikte, verrijkte omgeving.
	3.4.4.2 Therapie evaluatie in het marrnaset MPTP-model.: citaat: Voor de marmosetaap zijn diverse niet-invasieve gedragstesten ontwikkeld waarbij motor gerelateerde functies gekwantificeerd kunnen worden. Deze taken kunnen op een standaard manier worden uitgevoerd zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Een deel van deze testen kunnen plaatsvinden in de thuiskooi. Een voorbeeld is de 24-uurs activiteit in de thuiskooi middels een kleine draagbare actiemeter die aan de halsketting voor identificatie wordt bevestigd. Alle testen worden uitgevoerd met behulp van spontane motivatie gebruikmakend van de voorkeur van de aap, zoals de klimtoren, of met gebruikmaking van voedsel beloning bij de hand-oog coördinatie test. De apen worden eerst 'gehabitueerd' aan de opstelling en daarna stapsgewijs voor de taak getraind. Doordat er diverse gedragstesten op hetzelfde dier worden uitgevoerd, is een nauwkeurigere meting van het effect van het kandidaat medicijn mogelijk. Dit lijdt tot verfijning en draagt tevens bij tot een nauwkeuriger bepaling van humane eindpunten. In geval van metingen van de hersenactiviteit (EEG), voor bijvoorbeeld slaap, wordt gebruik gemaakt van een telemetrisch systeem waardoor de aap zonder fixatie vrij kan bewegen in de thuiskooi. De procedure voor het aanbrengen van EEG-elektrodes is in eerdere studies verfijnd, waardoor de uitval van dieren door technische problemen sterk verminderd is (Bakker et al., (2014) Recovery time after intra-abdominal transmitter placement for telemetrlc (neuro) physiological measurement in freely moving common marmosets (Callitrlx jacchus), Animal Bloteiemetry 20142:10).
3.4.4.1 Bepaling van farmacakinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags blomerkers in gezonde marmosets.: 11.1	
3.4.4.2 Therapie evaluatie in het marrnaset MPTP-model.: 11.1	
Wettelijk vereist onderzoek Indien ja, is er sprake van herhaling?	Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.

3.4.4.1 Bepaling van farmacakinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags blomerkers in gezonde marmosets.: citaat: Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in I art. 1 e van de Wet op de Dierproeven.
3.4.4.2 Therapie evaluatie in het marrnaset MPTP-model.: citaat: Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1 e van de Wet op de Dierproeven. Van belang is wel dat er géén eerdere ingrepen hebben plaatsgevonden met een blijvend effect die het gedrag of de motorfunctie beïnvloedt of die een invloed hebben op het functioneren van de hersenen.

Naam proef	**Worden de dieren gedood?**	**Doden volgens richtlijn?**
3.4.4.1 Bepaling van farmacakinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags blomerkers in gezonde marmosets.	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Therapie evaluatie in het marrnaset MPTP-model.	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Bepaling van farmacakinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags blomerkers in gezonde marmosets.	HEP: In eerdere studies niet waargenomen, daarom is de inschatting dat iet meer dan 1% zal zijn.	citaat: Over het algemeen zijn er geen ernstige effecten te verwachten bij een farmacakinetiek en dosisbepaling. In geval een dier onverwacht emstig ziek wordt en niet behandeld kan worden, dan zal dit als eindpunt gelden en wordt het dier gedood. In dat geval zal het ongerief maximaal matig zijn.
Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus)	Ongerief: 100% Matig	
3.4.4.2 Therapie evaluatie in het marrnaset MPTP-model.	HEP: <5%	Indien een dier ernstig gewichtsverlies (>15% van het lichaamsgewicht), of ziekteverschijnselen (zoals braken of diarree) gaat vertonen zal in overleg met de veterinair worden besloten of behandeling nodig is of dat het dier uit de studie gehaald wordt. In geval van ernstige ziekteverschijnselen zal een dier direct uit studie worden genomen en geëuthanaseerd {gevolgd door uitgebrelde sectie) om verder ongerief te voorkomen. Dit vindt plaats wanneer het eindpunt volgens de klinische score* is bereikt waarbij de maximale gemiddelde cumulatieve score >3,5 is voor tenminste twee dagen, of wanneer het algemene welzijn door andere omstandigheden ernstig wordt aangetast. Anders worden de dieren geeuthanaseerd op het eindpunt van de studie. De humane eindpunten voorkomen dat matig ongerief ernstig wordt en daarom is er geen ernstig ongerief in deze dierproef. * De klinische score is zowel belangrijk als uitkomstparameter tijdens de studie als voor het bepalen van het humane eindpunt. Klinische score omvat o.a. verminderd vachtonderhoud {poetsgedrag), apathie
Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus)	Ongerief: 100% Matig	

5 Samenvatting

11.1

11.1 [redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

11.1 [redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

9

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020172687
Bijlagen
1

Datum 9 oktober 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 12 september 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson" met aanvraagnummer AVD5020020172687. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.
Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van een vergunning niet langer kan zijn dan 5 jaar.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf
Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie 10.2.g gevoegd. Dit advies is opgesteld op 11 september 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.

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
namens deze:
[redacted] 10.2.e en 10.2.g

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Datum:
9 oktober 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172687

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Evaluatie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson" met aanvraagnummer AVD5020020172687, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Wetenschappelijk medewerker, Neurobioloog.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 12 september 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 september 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 september 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 11 september 2017, ontvangen op 12 september 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Bepaling van farmacakinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde marmosets.				
	Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus) / marmosets	32	100% Matig	
3.4.4.2 Therapie evaluatie in het marrnaset MPTP-model.				
	Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus) / marmosets	105	100% Matig	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen
Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf.Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de

ernst de dierproeven conform de vergunning waren.
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. 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.

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD5020020172687

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen
Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging
De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.
In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

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

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

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

Beoordeling achteraf
Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

	Inventaris Wob-verzoek W19-02								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**documenten NTS20172884**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven 1 oud				x			x	
5	Bijlage dierproeven 2				x			x	
6	Bijlage dierproeven 3 oud				x			x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
10	Reactie aanvulling aanvraag				x		x		
11	Bijlage dierproeven 1 nieuw				x			x	
12	Bijlage dierproeven 3 nieuw				x			x	
13	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
14	Advies CCD				x				x
15	Beschikking en vergunning				x		x		

2884

Centrale Commissie Dierproeven

1

11 SEP. 2017

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

X Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 50200

☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

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

Naam instelling of organisatie	Biomedical Primate Research Centre
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e
KvK-nummer	41146967

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

Straat en huisnummer	Lange Kleiweg	161
Postbus	3306	
Postcode en plaats	2288 GJ Rijswijk	
IBAN	10.2.g	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting Biomedical Primate Research Centre	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	X Dhr. ☐ Mw.
Functie	10.2.e	
Afdeling		
Telefoonnummer	10.2.e en 10.2.g	
E-mailadres		

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

(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	☐ Dhr. X Mw.
Functie	10.2.g	
Afdeling		
Telefoonnummer	10.2.e en 10.2.g	
E-mailadres		

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

2 Over uw aanvraag

2.1	Wat voor aanvraag doet u?	X 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 - 12 - 2017
		Einddatum	31 - 11 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Ontwikkeling van antivirale middelen tegen dengue virusinfecties	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	10.2.g
		Postadres	
		E-mailadres	

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

X Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 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

X Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

X Projectvoorstel

X Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

X 3 bijlages

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	10.2.e
Functie	10.2.g
Plaats	Rijswijk
Datum	07 - 09 - 2017
Handtekening	10.2.e en 10.2.g

Centrale Commissie Dierproeven

2

Form
Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix t this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	Provide the title of the project.	Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection

2 Categories

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

☐ Basic research
X 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.

Dengue virus (DENV) is a mosquito-borne flavivirus with four different antigenically distinct serotypes (DENV-1 to -4). Infection with one of the serotypes can cause dengue fever, which is a severe, flu-like illness primarily affecting infants, young children and adults. Infection with a particular serotype confers life-long immunity against that specific type, but increases the risk of a more severe infection after a new infection with another serotype. In a small proportion of disease cases, such a secondary infection develops into the life-threatening dengue hemorrhagic fever (DHF), resulting in bleeding, low levels of blood platelets and blood plasma leakage, or into dengue shock syndrome (DSS), where dangerously low blood pressure occurs (19,20,21).

The incidence of dengue has grown dramatically around the world in recent decades. Over 2.5 billion people – over 40% of the world's population – are now at risk from dengue. The WHO currently estimates there may be 390 million infections per year, of which 100 million are clinically manifest infections (22). In several Asian countries, DHF has become an important cause of disease and death, mainly in children (18).

Dengue fever is primarily found in tropical and sub-tropical regions around the world. In recent years, transmission of DENV has increased predominantly in urban and semi-urban areas, and has become a major international public health concern. Before 1970, only nine countries had experienced severe dengue epidemics, but the disease is now endemic in 128 countries in Africa, the Americas, the Eastern Mediterranean, South-east Asia and the Western Pacific (22). Not only is the number of cases increasing, the disease continues to spread to new areas. Travel, international trade and climate change have contributed to the introduction of dengue virus and its mosquito vectors (mainly *Aedes aegypti* and *A. albopictus*) into new areas. The global expansion of dengue virus was preceded by the global spread of its mosquito vectors (mainly *Aedes aegypti* and *A. albopictus*) into new areas. Climate change, associated with rising temperatures and shifts in precipitation, has resulted in an expansion of habitats suitable for *A. aegypti* and *A. albopictus* (3,4,11).

The increasing worldwide presence of mosquito vectors for dengue virus transmission has had a major impact on the epidemiology of dengue virus. In the past 25 years, dengue has shown a marked global emergence and re-emergence, with more frequent and larger epidemics associated with more severe disease (12). Until the 1970s, the distribution of each DENV serotype was limited to specific areas in tropical regions, but since then, fueled by demographic and societal changes, but also international trade and travel, their distribution has expanded, and all four serotypes are now widely co-circulating in tropical and subtropical regions (13).

The threat of dengue fever now exists in Europe and the US. Local transmission has been reported for the first time in France and Croatia in 2010, followed by more cases in more recent years (15). In 2012, an outbreak of dengue on Madeira islands of Portugal resulted in over 2000 cases (1).

Despite the fact that DENV is known for decades, only recently, in 2015, the first dengue vaccine has become available, but antiviral drugs for the treatment or prevention of dengue virus infection are currently not available (9,20). In recent years, chemoprophylaxis, i.e. use of antivirals to prevent infection, is gaining more attention as an alternative to vaccination. Chemoprophylaxis could be beneficial for travelers to dengue endemic regions, as well as for vulnerable populations living in endemic regions (21). The concept behind chemoprophylaxis is that a dengue antiviral would be present in the human body prior to being bitten by a dengue-infected mosquito. By blunting the peak viral load (maximum amount of DENV RNA measured in the blood/tissues during viral replication), dengue-associated morbidity and mortality could potentially be reduced significantly, or even prevented. Next to that, a potent and safe dengue antiviral small molecule may also be used as a therapeutic agent.

Presently, only two animal models are used in dengue virus research. Wild-type, and various immuno-deficient mice models are used in DENV research to investigate various aspects of DENV pathogenesis. However, a major drawback of these rodent models is that the virus infection is done via the highly artificial intracranial route, and that resultant virus replication is low (24). In contrast, nonhuman primates are the only natural vertebrate hosts besides humans that are susceptible to infection with the four dengue serotypes (16). Rhesus macaques are the only animal model that mimics dengue virus viremia and anti-dengue immune responses in humans (2,24). For antiviral compound evaluation macaques, in contrast to mice, have the advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans

(5,6,10). As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly.
The latter features, in combination with the susceptibility to DENV infection and the similarity of viremia to the human infection, renders the rhesus macaque an important preclinical animal model, and our animal model of choice, to investigate the safety and efficacy of potential anti-DENV compounds for human use.

3.2 Purpose

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

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

The **ultimate goal** is to develop prophylactic and therapeutic intervention strategies for dengue virus infections in humans
The **specific aim of this research project** is to evaluate safety and efficacy of dengue antiviral compounds in rhesus macaques.

Currently, no specific antiviral compounds are available for the treatment of DENV infections, or to be used as a prophylaxis. This research program contributes to the worldwide efforts to develop novel DENV antiviral compounds. Ultimately, after extensive *in vitro* testing, and *in vivo* evaluation in small animal models, antiviral compound safety and efficacy needs to be demonstrated in a suitable NHP species before they can be evaluated in clinical trials (17). The dengue antiviral compounds that will be tested at our institute in macaques will be in the final stages of their preclinical development, and require this last validation step in order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species, and that they are effective in animal species that have a drug metabolism and physiology closely resembling humans.

Our institute has extensive and long-standing expertise in conducting studies using nonhuman primates. Since 2012, we have been working on mosquito-transmitted virus infections in nonhuman primates, like West Nile virus, Zika virus, and dengue virus, and in 2015 we have performed a pharmacokinetics study using an experimental anti-DENV compound. We have the appropriate facilities and experience to work with these pathogenic viruses at DM-3 and ML-3 biosafety conditions. In addition, we have the appropriate virological and immunological assays for assessment of the efficacy against DENV. Our long-standing experience with flaviviruses, including dengue virus, guarantees that these animal studies will be adequately performed.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?
The incidence of DENV worldwide has increased 30-fold over the last 50 years. It has been estimated by the WHO that 100 million clinically apparent dengue virus infections occur every year, resulting in 500.000 hospitalizations due to severe dengue, and 25.000 deaths. The rapid spread of DENV to new territories, and its potential to induce high morbidity and mortality in humans clearly shows the necessity for the development of vaccines, and to the requirement of antiviral compounds.
Dengue virus vaccine development is hampered by a phenomenon known as 'antibody dependent enhancement' (ADE): infection by one of the four dengue virus serotypes confers lasting protection against homotypic re-infection, but a secondary infection with another serotype is associated with an increased risk of severe dengue disease. ADE is caused by antibodies that bind to the virus, but are incapable of neutralizing the virus. The challenge and difficulty in the development of a dengue vaccine is to avoid ADE elicited by vaccine-induced antibodies. Currently, there is only one dengue virus vaccine available which is directed to all 4 serotypes. For younger children, this vaccine is considered unsafe because of possible vaccine-induced ADE. Therefore, the vaccine is only recommended by the WHO for

use in healthy individuals older than 9 years of age that live in endemic areas with high dengue virus burden (25).

Because of the challenges in the development of a safe and efficacious dengue virus vaccine, antiviral drugs are pivotal in dengue-control strategies. Presently, no prophylactic or therapeutic antivirals against dengue virus are available. Prophylactic drugs, i.e. drugs to prevent infection, are beneficial for travelers to dengue endemic regions, as well as for vulnerable populations living in endemic regions. Therapeutic anti-DENV compounds could be used to prevent, or to dampen, disease symptoms related to dengue hemorrhagic fever or dengue shock syndrome. In addition, prophylactic use of antiviral drugs can potentially prevent further spread of dengue virus, as the use of antiviral drugs may lower the number of viremic humans. This will have a direct impact on the infected human host-to-mosquito transmission cycle, resulting in less new infections.

The WHO has launched a Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2010-2020 (23) in which WHO sets three major objectives:

- reduction of dengue mortality by at least 50% by 2020
- reduction of dengue morbidity by at least 25% by 2020, and
- estimation of the true burden of disease by 2015

The research described in this project fits within this WHO strategy, and the proposal will contribute significantly to the first two objectives set by the WHO.

References to section 3:

10.2.g

10.2.g

[redacted]

3.4 Research strategy

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

The evaluation of the efficacy of an antiviral compound to protect against infection (prophylactic use), or to interfere with an ongoing dengue infection (therapeutic use) requires that the virus inoculum stock of each new strain/serotype is tested for its infectivity and the course of viremia in the nonhuman primate species used, prior to efficacy testing (**Appendix 1**). Virus infection is performed by inoculating the animals via various routes; i.e. intradermal, subcutaneous, or intravenous, using different doses, or by infection using dengue virus-infected mosquitoes. Then, the onset of viremia, its duration, and the total virus production in blood are determined.

Determination of the optimal dosage of an antiviral compound requires that this compound is administered to a number of NHP using various routes; i.e. oral, intravenous, and that at various time-points post-administration the level of the active compound is determined in the animals (**Appendix 2**).

The efficacy of a specific antiviral compound is determined using two different study protocols: a **prophylactic efficacy study**, and/or **a therapeutic efficacy study protocol**. In both study protocols a standard viral inoculum (determined in Appendix 1), and an established antiviral compound dose (determined in Appendix 2) will be used. In the prophylactic efficacy study protocol animals will first be given an antiviral compound, followed by experimental infection with the virus. In the therapeutic efficacy study protocol, the animals will first be infected and at a later time-point be given the antiviral compound. In both protocols, the decrease in blood viral load will be measured as an indicator of antiviral activity (**Appendix 3**)

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.

1. Dengue virus infection in NHP.

In order to establish the infectivity and to characterize the course of viremia of a dengue virus stock, animals will be infected and monitored for clinical symptoms, body temperature (fever), body weight, and changes in blood parameters. Blood samples will be collected to determine several virological parameters, like start of viremia, peak viremia, and the amount of virus produced. To evaluate a new virus or viral stock, the virus may be inoculated via different routes; i.e. intradermal, subcutaneous, or intravenous.

2. Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in NHP.
For this type of study, animals will be administered with different dosages of an antiviral compound. If necessary, the compound may be given at multiple time-points over a certain time period. At regular time-points after administration, blood samples will be collected for measurement of the concentration of the compound, or active component thereof. In parallel, blood chemistry and hematology will be performed to monitor for adverse effects of the compound. General behaviour, health and body temperature will also be monitored.

3. DENV antiviral efficacy study in NHP.
The efficacy of a specific compound against dengue virus may be determined using two different study protocols: a prophylactic efficacy study, or a therapeutic efficacy study protocol, depending on the research question. In both protocols a standard viral inoculum, and an established antiviral compound dose will be used.
In the prophylactic efficacy study protocol animals will first be given an antiviral compound, followed by experimental infection with the virus. In the therapeutic efficacy study protocol, the animals will first be infected, and at a later time-point be given the antiviral compound. In the protocols, the absence or decrease in blood viral load will be measured as an indicator of antiviral activity. Additionally, during the studies the animals will be monitored for adverse effects of the compound, including monitoring of general behaviour and health. A group of non-treated animals will be included as infection controls.

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.

Antiviral efficacy testing in macaques requires that the viral inoculum used establishes a viral infection with a viral kinetic profile resembling that of human DENV infection. Therefore, the viral inoculum first needs to be tested in an infection study, as described in Appendix 1. Requirements to proceed from the dengue virus infection study to an antiviral compound efficacy study are:

1. All animals have to become infected, and
2. Variation between animals has to be limited. A high standard deviation value in the infection study directly affects the group size in an antiviral efficacy study, in order to obtain statistically significant results.

All antiviral compounds which will be evaluated in this research project meet the following criteria:

- the compound must have been tested in cell cultures for absence of toxicity and *in vitro* efficacy
- the compound must have been evaluated in small animal models for absence of toxicity
- if compounds can be adequately tested for their therapeutic of prophylactic effect in other than in the rhesus macaque model, macaques will not be used.

Anti-dengue virus compounds that fullfil the criteria for evaluation in macaques may be tested in a DENV antiviral compound efficacy study (Appendix 3). Before initiation of such a study, a PK study with the test compound has to be performed in order to determine the dosage needed to obtain sufficiently high levels of the active compound in the blood of a group NHPs (Appendix 2).

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	Dengue virus infection in nonhuman primates
2	Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates
3	DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

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	Ontwikkeling van antivirale middelen tegen dengue virusinfecties
1.2	Looptijd van het project	1 december 2017 – 1 december 2022
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Antivirale middelen, dengue virus, effectiviteit, apen

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- ☐ Fundamenteel onderzoek
- X Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)

Dengue is een door muggen overgedragen infectie die wordt veroorzaakt door het dengue virus. Dengue gaat gepaard met ernstige, griepachtige verschijnselen, en is in een deel van de patiënten levensbedreigend. De Nederlandse term voor dengue, knokkelkoorts, verwijst naar één van de kenmerkende symptomen: hevige gewrichtspijn. Het aantal gevallen van dengue is sterk toegenomen in de laatste decennia. Meer dan 2,5 miljard mensen (meer dan 40% van de wereldbevolking) lopen het risico op dengue. Jaarlijks zijn er 390 miljoen dengue infecties wereldwijd, waarvan circa 100 miljoen infecties resulteren in ziekteverschijnselen. Per jaar resulteert dit in een half miljoen ziekenhuis opnames en 25 duizend sterfgevallen.

Dengue komt vooral voor in tropische en subtropische gebieden over de hele wereld. In de afgelopen jaren is er een sterke toename van dengue. Vóór 1970 hadden slechts negen landen ernstige dengue-epidemieën meegemaakt. De ziekte wordt nu echter aangetroffen in meer dan 100

landen in Afrika, Amerika, het oostelijke Middellandse Zeegebied, zuidoost Azië, en de westelijke Stille Oceaan, en de dengue blijft zich verspreiden naar nieuwe gebieden, mede door de opwarming van de aarde en de toename in internationale handel en reizen.

Momenteel is slechts één dengue vaccin beschikbaar. Dit vaccin biedt echter geen volledige bescherming tegen alle dengue virusvarianten, geeft slechts bescherming voor een periode van 5-6 jaar, en daarnaast moet het vaccin meerdere malen worden toegediend voor optimale bescherming. Ook is niet geschikt voor gebruik bij kinderen jonger dan 9 jaar.

Antivirale middelen zijn daarom van grote (aanvullende) waarde voor de bestrijding van dengue. Echter, antivirale middelen zijn voor de behandeling van dengue zijn nog niet beschikbaar. Het doel van dit project is om antivirale middelen te ontwikkelen en te testen in makaken, die kunnen worden gebruikt om dengue virusinfecties te voorkomen (profylactisch gebruik), of te genezen (therapeutisch gebruik).

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

Het uiteindelijke doel van de experimenten die in het kader van dit project worden uitgevoerd is om antivirale middelen te ontwikkelen tegen het dengue virus. Bij profylactisch gebruik zouden deze middelen bescherming kunnen bieden tegen dengue virusinfecties die worden opgelopen tijdens (kortdurende) bezoeken aan dengue-gebieden, bijv. voor vakantie of werk. Therapeutisch gebruik van deze middelen zal het mogelijk maken om dengue virusinfecties te genezen, of om ernstige ziekteverschijnselen of overlijden te voorkomen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Er zullen in een periode van 5 jaar maximaal 316 resusapen (*Macaca mulatta*) nodig zijn.

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

De dieren kunnen ongerief ondervinden door de biotechnische handelingen, infectie met het dengue virus en het toedienen van kandidaat antivirale middelen

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

De maximale aantasting van het welzijn van de dieren zal matig zijn.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Afhankelijk van de soort studie, zullen de dieren deel kunnen blijven uitmaken van de experimentele kolonie op het instituut en worden hergebruikt voor ander onderzoek. Naar verwachting zullen maximaal 298 dieren tijdens de infectie en effectiviteit studies experimenteel worden geïnfecteerd met het dengue virus. Zij zullen dan na afloop worden geëuthanaseerd. Dit is nodig om nader onderzoek te doen naar de mogelijke aanwezigheid van virus in verschillende weefsels en organen nadat het uit het bloed is verdwenen, en voor onderzoek naar mogelijke schade aangericht door de dengue virusinfectie.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom

De kandidaat-antivirale middelen zijn eerst uitgebreid getest op hun werkzaamheid en mogelijke toxiciteit in celkweken. Daarna zijn muizen gebruikt in verschillende fasen van het onderzoek naar de werkzaamheid en toxiciteit. Uiteindelijk moet de veiligheid en werkzaamheid van antivirale verbindingen worden aangetoond in een diersoort welke de meeste overeenkomsten heeft met de mens voordat ze kunnen worden getest in

proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

klinische studies. Voor dit preklinisch onderzoek zijn makaken het meest geschikt vanwege de grote gelijkenis van hun immuunsysteem, metabolisme, en fysiologie met dat van de mens, en vanwege het feit dat makaken, in tegenstelling tot muizen, een dengue infectie doormaken die het meest overeenkomt met die in de mens. Dit maakt een optimale vertaling van bevindingen naar de mens mogelijk.

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

Voordat een antiviraal middel in apen wordt getest is het al uitgebreid getest op veiligheid en het vermogen om een bescherming te geven tegen dengue virusinfecties in het laboratorium en in het enige andere proefdiermodel voor dengue, de muis. Hierna worden alleen de meest veelbelovende middelen in apen uitgetest. Dit aantal benodigde dieren zal afhangen van de eigenschappen van het middel en van het te gebruiken testvirus. Het aantal zal per experiment worden bepaald op basis van de op dat moment beschikbare gegevens en literatuur. Waar mogelijk zullen meerdere middelen tegelijk getest worden, waardoor maar één controlegroep nodig is. In de farmacokinetiek studies zullen meerdere doseringen worden getest in hetzelfde dier, waardoor het totale aantal dieren in deze studies zo beperkt mogelijk zal zijn. In de effectiviteitsstudies wordt gebruik gemaakt van een twee-fase benadering. Na de eerste fase vindt statistische analyse plaats van de tot dan toe bereikte resultaten. Op basis van deze analyse wordt dan besloten om wel of niet door te gaan met fase 2. Hierdoor wordt voorkomen dat onnodig veel dieren worden.

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.

In de laatste fase van de ontwikkeling van de antivirale middelen, voordat deze in de mens zullen worden gebruikt, worden deze getest in makaken. Dit is essentieel, omdat deze dieren wat betreft hun lichaamsbouw, metabolisme van medicijnen en afweersysteem het meest op de mens lijken. Ook is een dengue infectie in makaken vergelijkbare met de infectie in de mens. Apen zijn naast de mens het enige zoogdiersoort dat een natuurlijke gastheer is voor het denguevirus. Zij kunnen op vergelijkbare wijze worden geïnfecteerd en ook de ontwikkeling van de infectie is in hoge mate vergelijkbaar met die in de mens. In apen is de kans daarom het grootst dat eventuele onverwachte nadelige effecten alsnog opgespoord kunnen worden, en een goede voorspelling gedaan kan worden wat betreft werkzaamheid bij de mens.

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

Dengue infecties in apen vertonen in het algemeen een mild verloop. Alle handelingen worden uitgevoerd onder verdoving. Waar nodig wordt bovendien pijnstilling gegeven. De dieren worden getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan de handelingen. Tijdens de studie worden de dieren dagelijks geobserveerd. Als een dier ziek wordt zal dit direct aan een dierenarts worden gemeld, en wanneer nodig zal een passende behandeling worden gestart. Indien nodig zal, na overleg met de veterinair, een dier direct uit een studie worden genomen en op een humane wijze worden gedood om verder ongerief te voorkomen.

Voor de farmacokinetiek studies worden gevoelig meetmethoden gebruikt om de aanwezigheid van het geneesmiddel in het bloed aan te tonen. Daarom zijn slechts kleine hoeveelheden bloed nodig in deze studies.

Om de dieren zo veel mogelijk natuurlijk gedrag te laten vertonen is op het onderzoeksinstituut een uitgebreid programma voor diertraining en kooiverrijking opgezet.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre	
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number 1	Type of animal procedure Dengue virus infection of nonhuman primates

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.

In order to evaluate the efficacy of an antiviral compound, it is necessary to have a well-defined dengue virus infection model. Previously, we have established a model for infection of macaques with a serotype 2 dengue strain. However, for new dengue viruses, dengue serotypes, or virus stocks that have not yet been tested at our institute, it is necessary to thoroughly characterize the viral kinetic profile in macaques before they can be applied in dengue antiviral compound efficacy evaluation studies. The main objective is to obtain an infection model with high similarity to human infection that is sufficiently robust to allow adequate evaluation of the effectiveness of antiviral compounds, in terms of reduction or prevention of virus replication.

In general, the study set-up is as follows: a group of animals will be infected and monitored for clinical symptoms, fever, body weight and changes in blood parameters. Blood samples will be collected at regular time points to determine if the animals have become infected and what the amount of virus production is. To evaluate a new virus, or viral inoculum, the virus is inoculated using a standard dose.

The primary outcome parameters for dengue virus infection are:

1. the peak viral load (PVL)
2. time-point of start of viremia, and
3. the number of infected animals per inoculum dose.

Secondary outcome parameters for dengue virus infection that will be evaluated are the:

1. viral RNA load over time,
2. duration of viremia, and
3. total amount of virus produced during viremia (AUC; area under the curve)

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

At the start of the study, the animals will be infected by intravenous, intradermal, or subcutaneous inoculation. Experimental infection using different numbers of dengue virus-infected mosquitoes may also be explored as the natural way of human dengue infection. At the same time, blood is collected for a zero-value determination. The animals will be monitored daily during the study period for general behaviour, appetite, faeces, etc., and at each time-point when the animals are sedated, body weight and body temperature will be measured. Typically, after infection of the animals, blood will be collected daily for a period of maximally 14 days to monitor the progress of the viral infection and to control for changes in clinical chemistry and hematology parameters. This intensive sampling is necessary because in this period significant and rapid changes in the amount of virus in the blood may occur. During this period of daily sampling the animals will be given tube feeding because the daily anesthesia has a negative influence on the appetite of the animals. In this way, the wellbeing of the animals is affected as little as possible. After this period, the frequency of blood collection will be brought down to maximally once every two days. After the animals have become virus-negative in the PCR for the first time, they may be followed for 2-3 weeks to confirm absence of the virus and to monitor for potential re-activations of virus replication. Thus, the length of an infection study will be maximally 5 weeks. At the end of the study, the animals will be humanely euthanized and necropsy will be performed for the collection of tissue samples for histopathological and virological tests. The latter will be done to investigate tissue and organ distribution of the virus, and to identify potential viral reservoirs. Viral reservoirs may contribute to virus re-activation, and are therefore of particular interest as targets for antiviral compounds.
The details of each study, regarding the route of infection, dose used, etc., will be submitted for approval to the AWB.

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

Presently, no or limited data are available regarding infection of rhesus macaques with low inoculum doses, as well as on the variation in viremia in macaques caused by different DENV serotypes in macaques. Therefore, no statistical calculations can be made regarding the number of animals needed in the infection studies. The group size is based on experience in flavivirus infection models, including DENV. We expect that with this number of animals, an adequate assessment can be made regarding the reproducibility of infection (all animals need to show virus replication), and on the variation in viremia, as measured in plasma. On the basis of the data from the experimental infections, a power calculation can be made about the number of animals needed in an antiviral compound evaluation study.

B. The animals

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

The experiments will be performed in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) n = 90. All rhesus macaques are purpose bred at our institute, or incidentally they will be obtained from a certified supplier in compliance with EU legislation. Both mature male and female animals can be used.

Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are highly susceptible to DENV infection and best mimic dengue virus infection and pathogenesis in humans (1-11). Additionally, their body weight allows the collection of relatively large blood volumes. This is crucial for experimental infection studies as the monitoring of viremia necessitates daily sampling for an extended period. For these reasons, rhesus macaques are the species of choice for the infection studies described here.
For each virus, or virus stock, we will test different inoculum doses in order to identify the inoculum that results in an optimal infection rate, a high peak viremia, in combination with an onset of viremia similar to that in humans, i.e. 3-7 days. A group size of six animals per inoculum is chosen because this will provide us with a reasonable estimate of the variability in infection rate and viremia for the different inocula. From the infection studies using different doses, an inoculum dose will be selected for use in antiviral efficacy studies.
The selection of the inoculum dose depends on the combination of the three primary outcome parameters: the PVL, onset of viremia, and number of infected animals. A thorough characterization of the inoculum is key to the antiviral compound efficacy studies, as a 1 log drop of the PVL under treatment versus vehicle is considered a biological relevant effect in the efficacy studies, and the

standard deviation (SD) value obtained in viral titration study directly influences the number of animal needed in the experimental groups (See Appendix 3, section 2A).
Therefore, a second, independent, infection study is planned, using the selected inoculum dose, to in-depth characterize the inter-animal variability of the selected inoculum in a larger animal sample size
In a period of 5 years we expect to test a maximum of three viral stock preparations. For each, we anticipate to test maximally 4 doses per viral stock, using 6 animals per group. In total, maximally 3 viral stocks x 4 doses x 6 animals = 72 animals will be used for the infection studies. For further analysis of the inter-animal variability using the selected inoculum dose we calculate maximally 6 animals per inoculum. Thus, an additional maximal number of 18 animals (3 viral stocks x 1 selected dose x 6 animals) are planned for these studies.

References

10.2.g

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals that will be used in these experiments, might have been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous flavivirus studies or that have pre-existing antibodies against flaviviruses are not suitable because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

X 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

Several animal species, primarily rodents and nonhuman primates have been used to study dengue virus infection. Of these different species, NHPs have the advantage that they physiologically and immunologically most closely resemble humans. This has important implications, both for antiviral compound evaluation as well as for the interaction of the host with dengue virus, since these are affected both by the physiology and by the reaction of the innate and adaptive immune system. The proper evaluation of the antiviral compounds requires adequate infection models in NHP, which is the purpose of the studies proposed here.

Reduction

This animal procedure involves the development of a dengue infection model in rhesus macaques for use in antiviral compound efficacy testing. Because of the expected variability in viral replication kinetics between different viral strains or stocks, no statistical support for the number of animals can be provided at this point. Based on the extensive experience with other viral infection models within the institute where this research will be performed, plus the limited experience with dengue infection in NHP and based on available literature, we expect that six animals per group will be sufficient in the first experiment. On the basis of the outcome of the first study the number of animals needed in follow up experiments can be calculated and less animals may be needed. Only the minimum number of animals needed will be used.

Refinement

Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Infection and bleeding take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or virus infection. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.

All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, the standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of dengue-related disease like (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma).

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute. During the studies animals will be observed daily by qualified animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool, they will be documented, and a veterinarian will be informed. Then, if necessary, measures will then be taken. All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relief the pain, if necessary. During the first 2 weeks of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.

The studies will be performed according the Dutch laws, and will cause no adverse effects on the environment.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

X No

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

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

X 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.

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

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

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

In case of symptoms caused by dengue virus infection, this can result in pain. For this purpose, oral or parenteral analgesia will be administered after consultation with the veterinarian.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort due to virus infection
2. Stress because of recovery from sedation
3. Reduced food intake due to repeated sedations

Explain why these effects may emerge.

1. Intradermal infection can cause mild irritation
2. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling and virus infection. Nausea and disorientation can sometimes be observed during recovery from the sedation.
3. Animals will be sedated daily during the first phase of the infection. This will have influence of the

appetite

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

1. If irritation occurs, this will be mild. It will therefore not be necessary to take additional measures.
2. Recovery of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
3. Animals will receive tube feeding via gavage. This is applied during sedation.

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.

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

In humans, approximately 10% of the dengue infections is clinically relevant. Clinical symptoms are very diverse and so far, there is no biomarker to predict the course of disease in advance. Several dengue infection studies have been described in macaques, and few clinical symptoms related to DENV infection have been described. Behavioural changes and some clinical signs have been recorded (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma), but none of these signs has been linked to serious DENV disease in macaques. The general condition of the animals will be monitored and registered in a dengue-customized clinical scoring list. If any of these symptoms is found, animal caretakers will directly contact the investigator and veterinarian. Together with all available information (haematology, clinical chemistry, general behaviour, additional clinical scoring and virological status) the veterinarian will judge the overall condition of the animal and will suggest the required follow up.

In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, the animal will be humanely euthanized at an earliest time point.

Indicate the likely incidence.

It is not expected that any of the animals will meet the criteria for euthanasia, so the percentage is zero

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the daily sedations after dengue virus infection.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

In order to investigate the presence of residual virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage caused by DENV, it is necessary to euthanize the animals

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

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

X Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre	
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number 2	Type of animal procedure Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates

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.

In order to evaluate the efficacy of an antiviral compound in the rhesus macaque model for dengue virus infection at our institute, the pharmacokinetics of the compound are tested using different dosages in order to determine the effective compound concentration in plasma after administration (the 'bioavailability'). If the results of such a PK study are positive, then, studies are planned to test the efficacy of the compound in rhesus macaques, for use as a prophylactic, as well as a therapeutic drug.

In general, the study set-up is as follows: a group of animals will be administered the compound in different doses. Typically, one group of animals will be intravenously given the compound. This group will act as control group, and will provide baseline data of the main PK parameter, like clearance of compound from the body, volume of distribution, and half-life of the compound. The experimental groups will be administered the compound orally and in different dosages. After administration, the animals will be bled at regular time points in order to determine the concentration of the compound in the blood. Comparison of the PK parameter values in the blood after iv administration and those found after oral administration will provide insight in the bioavailability of the compound.
The primary outcome parameters for the PK are:

1. the maximum concentration of the active compound in plasma, and
2. the total amount of the active compound in plasma in time

Secondary outcome parameters:

1. time to reach the maximum concentration in plasma,
2. time to last time point that compound is detectable in plasma,
3. half-life of compound

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

A typical PK study consists of groups of animals that are given the antiviral compound at different dosages and/or different routes of administration. One group will receive the compound by intravenous bolus in order to derive the main PK parameters (clearance, volume of distribution, half-life). The other groups will be given the compound orally. The used dosages will be calculated on basis of PK studies in other animal models. Typically, blood samples will be collected at regular time points until 24 h post-administration, and will then be performed daily until the end of the study (maximally 7 days post-administration).
The PK study may be designed as a study in which the animals are first given a low dose of compound. Then, after a wash-out period during which the compound is cleared from the body, the animals can be orally administered a second, higher oral dose of the compound, and blood will be collected at regular time points. Plasma from blood samples will then be analyzed for PK parameters.
As a follow-up to the single-dose PK study, animals may also receive antiviral compounds by repeated administration to determine if this prolonged bioavailability leads to either unwanted accumulation of the substance in the blood, or to an equally unwanted decrease because repeated-dosing influences the body metabolism. A prolonged bioavailability is essential when anti-DENV compounds are used as a prophylaxis, i.e. they should protect against DENV infection by mosquitos for a certain period. Essentially, blood sampling will be similar to a single-dose study, with multiple samplings the first day after administration, followed by daily blood collection until the next drug administration.

The details of each study, regarding the number of animals, the route of administration, dose used, and the time points of blood sampling, will be submitted for approval to the AWB.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.
A group size of 3 animals is the standard group size for PK studies. From previous PK studies in macaques, it was concluded that experimental groups of three animals are sufficient to obtain a pharmacokinetic profile in blood of the compounds. This group size is sufficiently large to allow insight in the variance between the individual animals and allows us to identify possible outliers.
Block randomization will be used for the group composition. The animals will be randomly allocated to treatment groups according to a randomized block design based on the sex and weight of the animals.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.
The experiments will be performed in 18 rhesus macaques (*Macaca mulatta*). All rhesus macaques are purpose bred at our institute, or incidentally they will be obtained from a certified supplier. Both mature male and female animals can be used.
Rhesus macaques are the species of choice for the PK studies described here. In contrast to other animal species that are used in dengue virus research, i.e. rodents, macaques have the advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans (1-3). As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly. This renders the macaque an important preclinical animal model to investigate the pharmacokinetics of potential anti-DENV compounds for human use.
Rhesus macaques are also the NHP species of choice for the dengue virus infection studies (Appendix 1). As the results of the experimental dengue virus infection of rhesus macaques, and those obtained from the PK studies, will be combined and applied in the antiviral efficacy studies (Appendix 3), it is essential that the pharmacokinetics of the anti-DENV compounds are evaluated in the same species.

In a period of 5 years we expect to test a maximum of three antiviral compounds. On basis of *in vitro* studies, and studies done in rodent models, a dosage range will be set that will then be evaluated in

macaques. For each compound, we plan to evaluate maximally five dosages in a single-dose PK study. The exact number of dosages that will be tested per compound will be decided per study, as this depends on the outcomes from in vitro studies and studies in rodents, as well as on experience from studies with related compounds.

In each PK study, 2 groups of 3 animals will receive 3 different dosages of the drug, as described in section A. The exact design of the study, including the number of dosages, will be submitted for approval to the AWB.

For the single-dose PK studies we plan to test maximally 3 compounds. Per compound we will test 6 different dosages (5 dosages+ 1 standard control dose given i.v.) in 2 groups of 3 animals = 6 animals per compound. For 3 compounds we will need 18 animals.

For each compound, a repeated-dose administration study is planned with groups of 3 animals. These animals will be selected from the group of animals used in the single-dose PK study.

Thus, over a 5-year period, maximally 18 animals will be needed for the PK studies.

References

10.2.g

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

X 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.

All compounds have been tested extensively for efficacy and toxicity in *in vitro* assays. Also, *in vivo* toxicity studies have been performed in rodents. Only when no side effects or signs of toxicity are found in the rodent model, the compounds will be evaluated in nonhuman primates.
In this animal procedure, the pharmacokinetic profile of anti-dengue compounds is determined in rhesus macaques, before their use in antiviral compound efficacy testing in the same animal species. A group size of 3 animals is the standard group size for PK studies. From previous PK studies, it was concluded that experimental groups of three animals are sufficient to obtain a pharmacokinetic profile of the compounds in blood of macaques. This group size allows us insight in the variance between the

individual animals, and at the same time allows us to identify possible outliers. Only the minimum number of animals needed, will be used.
Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling or compound administration. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Compound administration and blood sampling take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or compound administration. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.

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

For the PK studies using anti-dengue virus compounds, no safety and/or environmental risks can be envisioned. All compounds have been extensively tested *in vitro* and *in vivo in rodents* for their potential to inhibit dengue virus, but also for presence/absence of toxicity, before their evaluation in nonhuman primates.
Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute. During the study animals will be observed daily by qualified animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool then a veterinarian will be informed and measures will be discussed with the investigator and implemented. All handlings will be performed under sedation. On every time point when a handling is performed the animal will be weighed and closely examined. During the period that an animal is bled daily, the animal will receive tube feeding. This is necessary, because animals have to fast the night before the sedation and since animals will be sedated daily after infection the food intake during this period would otherwise be very limited.
The studies will be performed according to Dutch laws, and it is not expected that the experiments will have adverse effects on the environment

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

X No

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

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

X 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.

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

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

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

In case an animal suffers pain, oral or parenteral analgesia may be administered after consultation with the veterinarian.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Stress because of recovery from sedation
2. Reduced food intake due to repeated daily sedations for blood collection and compound administration
3. Discomfort due to administration of compound via gavage

Explain why these effects may emerge.

1. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling and compound administration. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
2. Animals will be sedated daily during the PK study for blood collection. Therefore, the animals will have to fast during that period.
3. Insertion of the tube may cause local irritation

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

1. Recovery of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
2. Animals will receive tube feeding via gavage. This is applied during sedation.
3. Insertion of the feeding tube will be done by experience caretakers. In case irritation occurs, this will be mild and no extra measures need to be taken

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.

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

It is not expected that animals will reach a humane endpoint due to the PK study. However, through intensive monitoring of the animals, deviations in behavior, appetite etc. will be noted quickly. In addition, the animals are weighed at each blood collection. A major weight loss of > 20% relative to the weight at the start of the study is seen as humane endpoint. In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, it will be humanely euthanized.

Indicate the likely incidence.

it is not expected that the animals reach the humane endpoint criteria. Therefore, the percentage is zero.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the daily sedations after

compound administration

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

X No

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

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

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

☐ Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre	
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number 3	Type of animal procedure DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates

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.

In order to evaluate the use of an antiviral compound to prevent dengue virus infection, we will use the following study set-up: a group of animals will be administered the compound. Then, the animals will be experimentally infected with dengue virus (as defined in Appendix 1), and blood samples are collected at regular time points to determine if the animals have been protected against infection, or if the viremia is influenced by the prophylactic administration of the compound. A group of animals will not receive the compound, and will be used as controls.
When a compound is evaluated for its therapeutic potential, i.e. to cure infection, animals will first be infected with dengue virus, and subsequently the compound will be administered. During the study, blood is collected at regular time points and tested for the presence or absence of virus.

The primary outcome parameter for antiviral efficacy will be the peak viral load (PVL).

Other, secondary outcome parameters for dengue virus infection that will be evaluated are:
1. the viral RNA load,
2. the duration of viremia,
3. the total amount of virus produced during viremia (AUC; area under the curve)

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

Prophylactic antiviral study:
At the start of the study, the animals will be administered the antiviral compound. The route of administration and the dosage used are based on a PK study with this compound performed in rhesus macaques (Appendix 2). At the same time blood is collected for a zero-value determination. Then, the animals are experimentally infected. The optimal route and inoculum dose are determined in an infection study with this inoculum in rhesus macaques (Appendix 1). At that time point, a group of animals that did not receive the compound will also be infected, and will act as untreated controls in the study. Typically, after infection of the animals, blood will be collected daily for a period of maximally 14 days to monitor the progress of the viral infection and to control for changes in clinical chemistry and hematology parameters. This intensive sampling is necessary because in this period significant and rapid changes in the amount of virus in the blood may occur in untreated animals. During this period of daily sampling the animals will be given liquid foods by means of a probe because the daily anesthesia necessitates fasting of the animals. In this way, the wellbeing of the animals is affected as little as possible. After this period, the frequency of blood collection will be brought down to maximally once every two days. After the untreated control animals have become virus-negative in the PCR for the first time, the groups may be followed for an extra period of 3-4 weeks to confirm absence of the virus and to monitor for sudden re-activations of virus replication in any of the animals. At the end of the study, maximally 6 weeks after the start, the animals will be humanely euthanized and necropsy will be performed for the collection of tissue samples for histopathological and virological tests. The animals will be monitored daily during the study period for general behaviour, appetite, faeces, etc., and at each time-point when the animals are sedated, body weight and body temperature will be measured.

Therapeutic antiviral study:
The set-up of a therapeutic study using the antiviral compound is essentially similar to the prophylactic study. However, in such a study the animals are first infected and then treated with the antiviral compound.

The details of each study, regarding the route of infection, dose used, number of animals used, will be submitted for approval to the AWB.

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

The statistical analysis for the NHP efficacy studies will focus on the peak viral load (PVL) value, which is calculated from the dengue virus infection studies (appendix 1). For PVL a 1 log drop (on log10 scale) under treatment versus vehicle is considered a biological relevant effect.
The design, and more specifically the sample size, of the study will aim to have a minimum of 80% power for detecting this relevant biological effect. Next to the size of the biological effect of interest also the variability in the data drives the required sample size. The true underlying standard deviation (SD) value is currently unknown and will be estimated based on the pilot viral titration study. [1]
Currently we work under the assumption of two potential scenarios, the first where the SD is 0.5 and the second where the SD is 1. For these two scenarios a formal power calculation[2] was performed where the necessary sample size as function of variability and biological effect was assessed under the following assumptions:

- 80% power and 5% type I-error
- One sided testing since we are specifically looking for a directional effect
- 2 group comparison: placebo versus one active dose
- 1:1 randomization ratio between vehicle and active treatment group
- Common variability between the two groups
- Two sample T-test type analysis.

The result is a planned total sample size of 20 or 26 animals for respectively an anticipated scenario with SD of 0.5 and with SD of 1. The actual sample size will be revisited once the viral titration study[1] is finalized where we aim to reliably quantify the actual between animal variability of the parameter of interest and if it changes in function of inoculum used.

B. The animals

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

The experiments will be performed in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) n = 208. All rhesus macaques are purpose bred at our institute, or incidentally they will be obtained from a certified supplier. Both mature male and female animals can be used.

Currently, only two animal models are used in dengue virus research. Mouse models are used in DENV research to investigate various aspects of DENV pathogenesis. However, a major drawback of these rodent models is that the dengue virus infection is done via the highly artificial intracranial route, and that resultant virus replication is low. In contrast, nonhuman primates are the only natural vertebrate hosts besides humans that are susceptible to infection with the four dengue serotypes Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are highly susceptible to DENV infection and best mimic dengue virus infection and pathogenesis in humans (1-11). Additionally, in contrast to other animal species that are used in dengue research, i.e. rodents, macaques have the great advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly (12-14). The latter features, in combination with the susceptibility to DENV infection and the similarity of viremia to the human infection, renders the rhesus macaque an important preclinical animal model, and our animal model of choice, to investigate the efficacy of potential anti-DENV compounds for human use. Furthermore, the body weight of macaques allows the collection of relatively large blood volumes. This is crucial for the antiviral efficacy studies, as the monitoring of viremia necessitates daily sampling for an extended period.

The study design will be a two-stage design where in the first part 10 animals out of N (being either 20 or 26 depending on scenario given in A.) will be randomized to vehicle and highest dose group to be studied in a 1:1 ratio. After completion of this treatment part, an interim analysis will be performed to estimate the drug effect and test for its significance. The second stage will depend on the results of the first with the following potential scenarios:

1. Significant treatment effect detected: the remaining N-10 animals are randomized into the vehicle, highest dose group and minimum two new dose groups to allow estimation of underlying dose response pattern,
2. Estimated treatment effect ≥ 1 log10 drop but not statistically significant: randomize extra X animals into vehicle and highest dose group and randomize the remaining (N-10-X) into minimum two new dose groups to allow estimation of underlying dose response pattern,
3. Estimated treatment effect < 1 log10 drop and not statistically significant: randomize remaining animals into the vehicle and highest dose group to increase precision of estimated treatment effect or, if other study data allow it, randomize the remaining animals into vehicle and a higher dose group than originally planned.

If the power calculation on basis of the results obtained in the first stage of the study indicates that no statistically significant results can be obtained in stage 2 with the addition of extra animals, this is seen as a 'no-go' for the second stage. The study will then be discontinued after the first stage.

Typically, an antiviral efficacy study consists of one control group of animals and one treatment group (max. 2 x 26 = 52 animals). In a period of 5 years we expect to test a maximum of two antiviral compounds, both in a prophylactic and a therapeutic efficacy study.
In total 208 animals are the maximum needed for the efficacy studies over a period of 5 years.
(2 compounds x 2 efficacy studies x 52 animals)

References:

10.2.g

10.2.g

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous flavivirus studies or that have pre-existing antibodies against flaviviruses are not suitable because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

X 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

Although animal models for dengue infection other than nonhuman primates (NHP) are also in use in research for DENV, NHP are the animal model that best mimic infection and pathogenesis in humans. Equally, in contrast to other animal species that are used in biomedical research, like rodents, macaques have the great advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly. This, in combination with the fact that DENV infection of macaques, mimics infection and pathogenesis in humans, renders the rhesus macaque preclinical animal model of choice to investigate the efficacy of potential anti-DENV compounds for human use.

Reduction
This study involves the efficacy testing of antiviral compounds in the dengue virus infection model in rhesus macaques. Because the variability in dengue viral replication kinetics in the macaques will only become available after the completion of the infection studies, the exact number of animals to be used in the studies cannot be provided at this point. Under A we have described the statistical analyses that will be performed on basis of the infection studies. Only the minimum number of animals needed will be used. If possible, studies will be combined. In such a case, one control group will suffice and the total number of animals will be reduced.
Refinement
Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Infection and bleeding take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or virus infection. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.
All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, a standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of dengue-related disease like (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma).

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute.
All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database thus facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relief the pain, if necessary.
During the first 2 weeks of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.
Regular analysis of haematological and clinical chemistry parameters is part of the experiment. During these experiments, the virus load in plasma will also be analysed as primary indicator of infection. These data will also be consulted to determine if changes in behaviour, appetite or stool are clinically relevant. If necessary, judged by the veterinarian, measures will then be taken to treat the animal.
The studies will be performed according the Dutch laws, and will cause no adverse effects on the environment.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

X No

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

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

X 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.

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

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

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

In case of symptoms caused by dengue virus infection, this can result in pain. For this purpose, oral or parenteral analgesia will be administered after consultation with the veterinarian.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort due to virus inoculation
2. Stress because of sedation
3. Reduced food intake due to repeated daily sedations

Explain why these effects may emerge.

1. Intradermal inoculation can cause mild irritation
2. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling and virus inoculation. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
3. Animals will be sedated daily during the first phase of the infection. This will have influence of the appetite

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

1. If irritation occurs, this will be mild. It will therefore not be necessary to take additional measures.
2. Recovery of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
3. Animals will receive tube feeding via gavage. This is applied during sedation for blood collection.

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.

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

In humans, approximately 10% of the dengue infections is clinically relevant. Clinical symptoms are very diverse and sofar there is no biomarker to predict the course of disease on forehand. So far, several dengue infection studies have been described in nonhuman primates. So far, few clinical symptoms related to DENV infection in NHP have been described. Behavioural changes and some clinical signs have been recorded (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma), but none of these signs has been linked to serious DENV disease in macaques. The general condition of the animals will be monitored and registered in a dengue-customized clinical scoring list. If any of these symptoms is found animal caretakers will directly contact the investigator and veterinarian. Together with all available information (haematology, clinical chemistry, general behaviour, additional clinical scoring and virological status) the veterinarian will judge the overall condition of the animal and suggest required follow up.

In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, the animals will be humanely euthanized at an earliest time point.

Indicate the likely incidence.

After DENV infection each animal may become seriously ill. Thus, the percentage is 100%

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative discomfort is estimated as moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

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

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

X Yes

7

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD5020020172884

2. Titel van het project: Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection.

3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van antivirale middelen tegen dengue virusinfecties

4. Type aanvraag:
   - ✓ nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
   - naam 10.2.g
   - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e
   - e-mailadres contactpersoon: 10.2.g

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ✓ ontvangen door DEC: 17-08-2017
   - ✓ aanvraag compleet: 17-08-2017
   - ✓ in vergadering besproken: 24-08-2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - ✓ termijnonderbreking(en) van 28-08-2017 tot 01-09-2017 en van 06-09-2017 tot 07-08-2017
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ✓ aanpassing aanvraag: 01-09-2017, 06-09-2017 en 07-09-2017
   - ✓ advies aan CCD: 08-09-2017

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
   De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend bij de DEC.

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

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

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
   - Datum
   - Plaats
   - Aantal aanwezige DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager
   - Gestelde vraag / vragen
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum: 28-08-2017 en 06-09-2017
   - Gestelde vraag/vragen: Enige tekstuele aanpassingen, aanvullende achtergrond informatie, verdere onderbouwing van de noodzaak om te testen in niet-humane primaten, nadere onderbouwing van het aantal benodigde dieren, nadere specificering van de primaire uitkomstparameters. Tevens werd gevraagd om aanvullende informatie over biotechnische handelingen, milieueffecten, verfijning en humane eindpunten
   - Datum antwoord: 01-09-2017 en 07-09-2017
   - Verstrekt(e) antwoord(en): Het project is aangepast in het format projectvoorstel dierproeven (ziekteverschijnselen en pathogenese dengue infectie, vergelijk met andere diermodellen) en in de bijlages (onderbouwing aantal benodigde dieren, nadere specificering uitkomstparameters, aanvullende informatie biotechnische handelingen, milieueffecten, verfijning en gebruik klinische scoringstabel voor het monitoren van het verloop van de dengue infectie en voor het vaststellen van humane eindpunten).
   - De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC). N.v.t.
    - Aard expertise
    - Deskundigheid expert
    - Datum verzoek
    - Strekking van het verzoek
    - Datum expert advies
    - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen de immunologie, virologie, statistische analyse, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming. De DEC heeft ervaring met het beoordelen van onderzoek naar kandidaat geneesmiddelen tegen virale infecties in niet-humane primaten.

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. Een van de DEC leden was betrokken bij de aanvraag. Deze persoon heeft zich teruggetrokken van de vergadering bij de bespreking van de aanvraag en overigens geen aandeel gehad in de afweging en advisering.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het voorgestelde onderzoek bestaat uit drie fasen, te weten 1) het opzetten en optimaliseren van het dengue infectie model om bij de evaluatie van kandidaat antivirale middelen vast te kunnen stellen of deze effectief zijn tegen de infectie, 2) PK studies om de juiste dosering van de kandidaat antivirale middelen te bepalen en 3) evalueren of het kandidaat antivirale middel profylactisch en/of therapeutisch effectief is tegen dengue virus infectie. De subdoelen sluiten logisch aan bij het hoofddoel en vormen een samenhangend geheel.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorie, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek', sluit aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag worden nieuwe kandidaat antivirale middelen getest op hun vermogen om dengue infectie te voorkomen (bij profylactische toepassing) of de dengue virus multiplicatie te verminderen (bij profylactische en therapeutische toepassing).

   Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Het directe doel van het project is het testen van kandidaat antivirale middelen tegen dengue op veiligheid en effectiviteit in niet-humane primaten. Het uiteindelijke doel is het bijdragen aan het beschikbaar komen van effectieve antivirale middelen tegen dengue, die zowel ter bescherming tegen infectie als therapeutisch kunnen worden toegepast. Naar schatting raken jaarlijks 100 miljoen mensen geïnfecteerd met dengue, worden daardoor een half miljoen in het ziekenhuis opgenomen en overlijden 25 duizend mensen. Bovendien verspreidt het virus zich door toegenomen internationaal handels en reisverkeer en klimaatverandering naar nieuwe gebieden, waar in de menselijke populatie nog geen immuniteit tegen het virus is opgebouwd. Momenteel is er één dengue vaccin beschikbaar dat echter niet even effectief is tegen alle serotypen. Er is nog geen antiviraal middel tegen dengue beschikbaar. Met het beschikbaar komen van antivirale middelen kunnen hopelijk de WHO doelstellingen, namelijk vermindering van de dengue mortaliteit met 50% en de morbiditeit met 25% tegen 2020 gehaald worden. Tevens kan bij gebruik als profylaxis dengue infectie voorkomen worden bij bepaalde risicogroepen, zoals reizigers en medisch personeel. Het betreft hier *pre-klinisch* onderzoek. Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld).* De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een effectief antiviraal middel tegen dengue zijn de te beschermen personen, de proefdieren en het onderzoeksveld.

   Voor de te beschermen personen is het beschikbaar komen van een effectief antiviraal middel

tegen dengue van groot belang, aangezien het de multiplicatie van het virus kan onderdrukken en daardoor de ziekteverschijnselen en sterfte kan voorkomen. Ook kunnen door profylactische toepassing bepaalde risicogroepen beschermd worden, zoals reizigers en medisch personeel.

Het belang voor de samenleving is dat voor bepaalde risicogroepen infectie met dengue voorkomen kan worden en dat met dengue geïnfecteerde personen die ziekteverschijnselen vertonen genezen kunnen worden. Dit resulteert in; een sterke verbetering van de gezondheid van grote groepen mensen, en minder sterft en minder verlies in economische productiviteit.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen stress ondervinden, mogelijk in lichte mate ziek worden en soms enige mate van pijn ondervinden.

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s). Dit onderzoek kan leiden tot meer inzicht in het vermogen van diverse typen antivirale middelen om dengue virus multiplicatie te verminderen.

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

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. Hoewel de ervaring met het dengue infectie model vrij beperkt is zijn kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven in grote mate aanwezig op het gebied van infectie van non-humane primaten met onder andere door muskieten overdraagbare virussen alsmede de aandacht voor de drie V's op dit gebied. Kennis en kunde worden verder onderbouwd door de wetenschappelijke output en de verworven interne- en externe financiering.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

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

   ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
   ✓ Niet-menselijke primaten (10e)
   ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
   ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
   ☐ Zwerfdieren (10h)

✓ Hergebruik (1e, lid 2)
☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met dengue virus en de grote gelijkenis met de mens wat betreft het verloop van de infectie en de pathogenese. Bovendien vertoont deze diersoort zeer grote fysiologische overeenkomsten met de mens, hetgeen van belang is voor drug metabolisme, farmacokinetiek en mogelijke interacties met de organen/weefsels. De kandidaat antivirale middelen zijn tevoren gekarakteriseerd qua werkzaamheid en toxiciteit in *in vitro* en *in vivo* (veelal knaagdieren) modellen. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling van kandidaat antivirale middelen is het echter noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid te onderzoeken in een diermodel waarin de aard en verloop van de ziekte grote overeenkomsten vertonen met de mens. De eventuele nadelige effecten (bijvoorbeeld als gevolg van de interactie met het infectieus agens en de organen/weefsels) van de kandidaat antivirale middelen kunnen in dit diermodel worden bepaald.
Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.
De huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief is correct als matig ingeschat op basis van ervaring met PK en dengue infectie studies in niet-humane primaten en wordt veroorzaakt door de experimentele technieken, de toediening van antivirale middelen en de eventuele klinische symptomen ten gevolge van de infectie. In combinatie zijn de gevolgen van deze handelingen terecht als matig ongerief ingeschat. Door implementatie van humane eindpunten op basis van klinische symptomen wordt ernstig ongerief vermeden. De dieren voor de experimenten zijn speciaal voor dit doel gefokt, en zullen als sociaal compatibel duo worden gehuisvest.

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 die voor PK studie worden gebruikt wordt aangetast door de toediening van kandidaat antivirale middelen en frequente bloedafnames. Deze aantasting van de integriteit is van voorbijgaande aard. Bij de overige experimenten wordt de integriteit van de dieren aangetast door dengue virus infectie, de frequente bloedafnames en in een deel van de dieren door toediening van kandidaat antivirale middelen. De dieren worden aan het eind van de studie, of eerder bij het bereiken van een humaan eindpunt, gedood. Het doden van de dieren aan het eind van de effectiviteits studie is nodig om vast te kunnen stellen of nog virus aanwezig is in de weefsels en organen en om eventuele schade aan de weefsels ten gevolge van de infectie te kunnen bepalen.

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 zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven (gebaseerd op algemene en specifieke criteria) en is de kans dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken adequaat ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Nieuwe antivirale middelen worden vaak eerst *in vitro* getest. Echter vaak is dan niet duidelijk of de medicijnen hun specifieke doel binnen het organisme zullen bereiken. Daarom is gebruik van proefdieren noodzakelijk. Verschillende diersoorten worden gebruikt voor onderzoek naar de effectiviteit van antivirale middelen tegen dengue. Echter door fysiologische en anatomische overeenkomsten, en de effecten daarvan op drug metabolisme, farmacokinetiek en interactie met de organen/weefsels, zijn niet-humane primaten het best voorspellend voor effectiviteit bij de mens. In de experimenten in niet-humane primaten kunnen inzichten in effectiviteit en mogelijke bijwerkingen naar voren komen die bij onderzoek met andere diersoorten gemist zouden zijn. Deze stap over te slaan en direct onderzoek met menselijke vrijwilligers te verrichten is in dit stadium van de ontwikkeling van kandidaat antivirale middelen daarom dan ook niet verantwoord.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe. Het aantal dieren dat nodig is voor de studies voor het opzetten van het infectie model (bijlage 1) en voor de PK studies (bijlage 2) is op basis van ervaring uit eerdere studies gekozen en tot een minimum beperkt. Het aantal benodigde dieren voor de *in vivo* evaluatie van de effectiviteit van kandidaat antivirale middelen (bijlage 3) wordt bepaald met behulp van statische powerberekeningen op basis van de gegevens verkregen uit het opzetten van het infectie model. Bij het onderzoeken van meerdere kandidaten geneesmiddelen binnen een proefopzet zal het aantal controlegroepen beperkt worden. Het werkelijk aantal dieren dat gebruikt zal worden in dit project wordt bepaald door het aanbod van kandidaat geneesmiddelen en kan daardoor mogelijk lager uitvallen dan het gevraagde maximum.

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 uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren die goed aan mensen gewend zijn, de dieren zijn bovendien getraind om zo veel mogelijk mee te werken aan bepaalde dier technische handelingen, waardoor ze minder stress ervaren. Sedatie en pijnbestrijding zullen worden toegepast wanneer geïndiceerd. Bij onverwacht grotere welzijnsaantasting dan voorzien zal een humaan eindpunt worden toegepast. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

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

toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. Bij PK studies zullen de dieren in leven blijven aan het einde van het experiment. De dieren waarbij inoculatie met dengue heeft plaats gevonden worden gedood aan het einde van het experiment om de pathologie te bepalen en de aanwezigheid van het virus in de weefsels te meten. Daarnaast worden dieren ge-euthanaseerd wanneer humane eindpuntcriteria worden bereikt, dit om verder ongerief te voorkomen (zoals gedefinieerd in de projectaanvraag). Er wordt een passende dodingsmethode gebruikt (conform bijlage IV van de richtlijn).

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. Hergebruik wordt altijd overwogen en ook nagestreefd (binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke kwaliteit).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het testen van nieuwe kandidaat antivirale middelen tegen dengue het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeks modellen.

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

   De waarden voor de samenleving zijn gelegen in het ontwikkelen van antivirale middelen tegen dengue. Naar schatting raken jaarlijks 100 miljoen mensen geïnfecteerd met dengue. Bij een half miljoen mensen leidt de ziekte tot ziekenhuis opname en 25 duizend mensen overlijden ten gevolge van de ziekte. Er is één dengue vaccin beschikbaar dat echter niet even effectief is tegen alle serotypen. Er zijn nog geen antivirale middelen beschikbaar. Met een effectief antiviraal middel kan ziekte en sterfte en in bepaalde doelgroepen infectie voorkomen worden. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn van de samenleving (minder doden, minder zieken).

   Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze kunnen in lichte mate ziek worden en enige pijn ondervinden door bloedafnames, injecties en infectie met dengue. De dieren ondervinden hiervan matig ongerief.

   De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de werking van potentiële antivirale middelen tegen dengue. Daarmee is dit onderzoek informatief en het is de uitdrukkelijke bedoeling om dit te publiceren.

   Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van antivirale

middelen die ernstige ziekte en sterfte ten gevolge van dengue infectie kunnen voorkomen. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

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

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

Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat het ontwikkelen van een effectief antiviraal middel tegen dengue met dengue geïnfecteerde mensen kan genezen en mogelijk infectie met dengue kan voorkomen bij gebruik als profylaxe. Daarnaast kan dit onderzoek meer inzicht geven in de eigenschappen die een antiviraal middel moet hebben om effectief de multiplicatie van het dengue virus te onderdrukken.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek naar door muggen overdraagbare virale infecties, inclusief dengue, en de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor de dengue infectie en voor de PK studies, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor dengue infectie, het vergelijkbare verloop van de infectie en pathogenese en de zeer grote fysiologische en anatomische overeenkomsten met de mens. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. De 3V-principes worden gehonoreerd door hergebruik van dieren, en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen (positive reinforcement). Het ongerief is maximaal matig. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. De te onderzoeken antivirale middelen zijn in gevorderde stadia van ontwikkeling. De kandidaat medicijnen zijn tevoren gekarakteriseerd in *in vitro* en *in vivo* (veelal knaagdieren) modellen. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling is het echter noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid te onderzoeken in een diermodel waarin de aard en verloop van de ziekte, alsmede de mogelijke interactie tussen kandidaat antiviraal middel en de organen/weefsels, grote overeenkomsten vertonen met de mens. De effecten van de kandidaat antivirale middelen kunnen in dit diermodel goed worden onderzocht en ook kunnen eventuele nadelige effecten aan het licht komen.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
   - ✓ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
     - ✓ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus. De belanghebbende die lid is van de DEC heeft geen aandeel gehad in de totstandkoming van dit advies.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.

Centrale Commissie Dierproeven

8

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020172884
Bijlagen
2

Datum 11 september 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 september 2017. Het gaat om uw project "Evaluation of prophylactic and therapeutic Intervention strategles against dengue virus infection". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020172884. 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.

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	50200
Naam instelling of organisatie:	Biomedical Primate Research Centre
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	10.2.e
KvK-nummer:	41146967
Straat en huisnummer:	Lange Kleiweg 161
Postbus:	3306
Postcode en plaats:	2288 GJ RIJSWIJK
IBAN:	10.2.g
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Stichting Biomedical Primate Research Centre

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

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 december 2017
Geplande einddatum:	30 november 2022
Titel project:	Evaluation of prophylactic and therapeutic Intervention strategles against dengue virus infection
Titel niet-technische samenvatting:	Ontwikkeling van antivirale middelen tegen dengue viruslnfecties
Naam DEC:	10.2.g
Postadres DEC:	10.2.g
E-mailadres DEC:	10.2.e

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.541,-
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

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

Ondertekening

Naam:	10.2.e
Functie:	10.2.g
Plaats:	Rijswijk
Datum:	7 september 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020172884
Bijlagen
2

Datum 11 september 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 11 september 2017
Vervaldatum: 11 oktober 2017
Factuurnummer: 172884

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5020020172884	€ 1.541,00

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

Centrale Commissie Dierproeven

9

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020172884

Datum 29 september 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 8 september 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection" met aanvraagnummer AVD5020020172884. 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:

Niet technische samenvatting
De NTS die u heeft gestuurd is langer dan ongeveer 500 woorden en bij de 3V's worden teksten herhaald. Kunt u een nieuwe NTS sturen die korter is en daarnaast beter aansluit bij de handelingen zoals beschreven in de aanvraag? De handelingen aan de dieren zijn meer dan nu onder 3.4 beschreven.

Onduidelijkheden
Kunt u een nieuwe Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 sturen waarin u onder L ook aangeeft waarom de dieren gedood worden?

Kunt u daarnaast aangeven waarom u voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 niet verwacht dat de dieren de humane eindpunten zullen bereiken en voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 alle dieren?
Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Datum:
29 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

Opsturen binnen veertien dagen
Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt 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. 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
- Niet technische samenvatting

Centrale Commissie Dierproeven

Melding bijlagen

U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg altijd deze Melding Bijlagen toe.
Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Biomedical Primate Research Centre

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD5020020172884

2 Bijlagen
Welke bijlagen stuurt u mee?
Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

O Projectvoorstel

O Beschrijving Dierproeven

O Niet-technische samenvatting

O Melding Machtiging

O Aanvraagformulier

O .....

O .....

O .....

Datum:
29 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

3 Ondertekening

Naam: .....

Datum: ..... - ..... - .....

Handtekening: .....

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte mevrouw, heer,

Naar aanleiding van uw verzoek om aanvullende informatie betreffende onze aanvraag projectvergunning Dierproeven, AVD5020020172884, stuur ik u de gevraagde aangepaste documenten.

De volgende aanpassingen zijn gedaan:

- De NTS is ingekort en herschreven
- De handelingen beschreven onder 3.4 van de NTS zijn uitgebreider beschreven
- Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 (Appendix 3), sectie L, is nu ingevuld. Bij het overzetten van de draftversie naar de definitieve aanvraag is dit over het hoofd gezien. Mijn excuses hiervoor.
- Het humane eindpunt zoals weergegeven in Bijlage 3.4.4.1 (Appendix 1) is aangepast. Ook hier is bij het overzetten van de draftversie naar de definitieve aanvraag een fout gemaakt. Ook hiervoor mijn excuses.

Ik hoop dat ik de documenten naar tevredenheid heb ingevuld en zie uw reactie graag tegemoet

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 1 Type of animal procedure: Dengue virus infection of nonhuman primates

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.

In order to evaluate the efficacy of an antiviral compound, it is necessary to have a well-defined dengue virus infection model. Previously, we have established a model for infection of macaques with a serotype 2 dengue strain. However, for new dengue viruses, dengue serotypes, or virus stocks that have not yet been tested at our institute, it is necessary to thoroughly characterize the viral kinetic profile in macaques before they can be applied in dengue antiviral compound efficacy evaluation studies. The main objective is to obtain an infection model with high similarity to human infection that is sufficiently robust to allow adequate evaluation of the effectiveness of antiviral compounds, in terms of reduction or prevention of virus replication.

In general, the study set-up is as follows: a group of animals will be infected and monitored for clinical symptoms, fever, body weight and changes in blood parameters. Blood samples will be collected at regular time points to determine if the animals have become infected and what the amount of virus production is. To evaluate a new virus, or viral inoculum, the virus is inoculated using a standard dose.

The primary outcome parameters for dengue virus infection are:

1. the peak viral load (PVL)
2. time-point of start of viremia, and
3. the number of infected animals per inoculum dose.

Secondary outcome parameters for dengue virus infection that will be evaluated are the:

1. viral RNA load over time,
2. duration of viremia, and
3. total amount of virus produced during viremia (AUC; area under the curve)

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

At the start of the study, the animals will be infected by intravenous, intradermal, or subcutaneous inoculation. Experimental infection using different numbers of dengue virus-infected mosquitoes may also be explored as the natural way of human dengue infection. At the same time, blood is collected for a zero-value determination. The animals will be monitored daily during the study period for general behaviour, appetite, faeces, etc., and at each time-point when the animals are sedated, body weight and body temperature will be measured. Typically, after infection of the animals, blood will be collected daily for a period of maximally 14 days to monitor the progress of the viral infection and to control for changes in clinical chemistry and hematology parameters. This intensive sampling is necessary because in this period significant and rapid changes in the amount of virus in the blood may occur. During this period of daily sampling the animals will be given tube feeding because the daily anesthesia has a negative influence on the appetite of the animals. In this way, the wellbeing of the animals is affected as little as possible. After this period, the frequency of blood collection will be brought down to maximally once every two days. After the animals have become virus-negative in the PCR for the first time, they may be followed for 2-3 weeks to confirm absence of the virus and to monitor for potential re-activations of virus replication. Thus, the length of an infection study will be maximally 5 weeks. At the end of the study, the animals will be humanely euthanized and necropsy will be performed for the collection of tissue samples for histopathological and virological tests. The latter will be done to investigate tissue and organ distribution of the virus, and to identify potential viral reservoirs. Viral reservoirs may contribute to virus re-activation, and are therefore of particular interest as targets for antiviral compounds.
The details of each study, regarding the route of infection, dose used, etc., will be submitted for approval to the AWB.

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

Presently, no or limited data are available regarding infection of rhesus macaques with low inoculum doses, as well as on the variation in viremia in macaques caused by different DENV serotypes in macaques. Therefore, no statistical calculations can be made regarding the number of animals needed in the infection studies. The group size is based on experience in flavivirus infection models, including DENV. We expect that with this number of animals, an adequate assessment can be made regarding the reproducibility of infection (all animals need to show virus replication), and on the variation in viremia, as measured in plasma. On the basis of the data from the experimental infections, a power calculation can be made about the number of animals needed in an antiviral compound evaluation study.

B. The animals

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

The experiments will be performed in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) n = 90. All rhesus macaques are purpose bred at our institute, or incidentally they will be obtained from a certified supplier in compliance with EU legislation. Both mature male and female animals can be used.

Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are highly susceptible to DENV infection and best mimic dengue virus infection and pathogenesis in humans (1-11). Additionally, their body weight allows the collection of relatively large blood volumes. This is crucial for experimental infection studies as the monitoring of viremia necessitates daily sampling for an extended period. For these reasons, rhesus macaques are the species of choice for the infection studies described here.
For each virus, or virus stock, we will test different inoculum doses in order to identify the inoculum that results in an optimal infection rate, a high peak viremia, in combination with an onset of viremia similar to that in humans, i.e. 3-7 days. A group size of six animals per inoculum is chosen because this will provide us with a reasonable estimate of the variability in infection rate and viremia for the different inocula. From the infection studies using different doses, an inoculum dose will be selected for use in antiviral efficacy studies.
The selection of the inoculum dose depends on the combination of the three primary outcome parameters: the PVL, onset of viremia, and number of infected animals. A thorough characterization of the inoculum is key to the antiviral compound efficacy studies, as a 1 log drop of the PVL under treatment versus vehicle is considered a biological relevant effect in the efficacy studies, and the

standard deviation (SD) value obtained in viral titration study directly influences the number of animal needed in the experimental groups (See Appendix 3, section 2A).
Therefore, a second, independent, infection study is planned, using the selected inoculum dose, to in-depth characterize the inter-animal variability of the selected inoculum in a larger animal sample size
In a period of 5 years we expect to test a maximum of three viral stock preparations. For each, we anticipate to test maximally 4 doses per viral stock, using 6 animals per group. In total, maximally 3 viral stocks x 4 doses x 6 animals = 72 animals will be used for the infection studies. For further analysis of the inter-animal variability using the selected inoculum dose we calculate maximally 6 animals per inoculum. Thus, an additional maximal number of 18 animals (3 viral stocks x 1 selected dose x 6 animals) are planned for these studies.

References

10.2.g

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals that will be used in these experiments, might have been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous flavivirus studies or that have pre-existing antibodies against flaviviruses are not suitable because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

X 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
Several animal species, primarily rodents and nonhuman primates have been used to study dengue virus infection. Of these different species, NHPs have the advantage that they physiologically and immunologically most closely resemble humans. This has important implications, both for antiviral compound evaluation as well as for the interaction of the host with dengue virus, since these are affected both by the physiology and by the reaction of the innate and adaptive immune system. The proper evaluation of the antiviral compounds requires adequate infection models in NHP, which is the purpose of the studies proposed here.
Reduction
This animal procedure involves the development of a dengue infection model in rhesus macaques for use in antiviral compound efficacy testing. Because of the expected variability in viral replication kinetics between different viral strains or stocks, no statistical support for the number of animals can be provided at this point. Based on the extensive experience with other viral infection models within the institute where this research will be performed, plus the limited experience with dengue infection in NHP and based on available literature, we expect that six animals per group will be sufficient in the first experiment. On the basis of the outcome of the first study the number of animals needed in follow up experiments can be calculated and less animals may be needed. Only the minimum number of animals needed will be used.
Refinement
Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Infection and bleeding take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or virus infection. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.
All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, the standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of dengue-related disease like (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma).

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute. During the studies animals will be observed daily by qualified animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool, they will be documented, and a veterinarian will be informed. Then, if necessary, measures will then be taken. All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relief the pain, if necessary. During the first 2 weeks of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.
The studies will be performed according the Dutch laws, and will cause no adverse effects on the environment.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

X No

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

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

X 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.

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

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

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

In case of symptoms caused by dengue virus infection, this can result in pain. For this purpose, oral or parenteral analgesia will be administered after consultation with the veterinarian.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort due to virus infection
2. Stress because of recovery from sedation
3. Reduced food intake due to repeated sedations

Explain why these effects may emerge.

1. Intradermal infection can cause mild irritation
2. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling and virus infection. Nausea and disorientation can sometimes be observed during recovery from the sedation.
3. Animals will be sedated daily during the first phase of the infection. This will have influence of the

appetite

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

1. If irritation occurs, this will be mild. It will therefore not be necessary to take additional measures.
2. Recovery of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
3. Animals will receive tube feeding via gavage. This is applied during sedation.

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.

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

In humans, approximately 10% of the dengue infections is clinically relevant. Clinical symptoms are very diverse and so far, there is no biomarker to predict the course of disease in advance. Several dengue infection studies have been described in macaques, and few clinical symptoms related to DENV infection have been described. Behavioural changes and some clinical signs have been recorded (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma), but none of these signs has been linked to serious DENV disease in macaques. The general condition of the animals will be monitored and registered in a dengue-customized clinical scoring list. If any of these symptoms is found, animal caretakers will directly contact the investigator and veterinarian. Together with all available information (haematology, clinical chemistry, general behaviour, additional clinical scoring and virological status) the veterinarian will judge the overall condition of the animal and will suggest the required follow up.

In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, the animal will be humanely euthanized at an earliest time point.

Indicate the likely incidence.

After DENV infection each animal may become seriously ill. Thus, the percentage is 100%

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the daily sedations after dengue virus infection.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

In order to investigate the presence of residual virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage caused by DENV, it is necessary to euthanize the animals

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

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

X Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 3 Type of animal procedure: DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates

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.

In order to evaluate the use of an antiviral compound to prevent dengue virus infection, we will use the following study set-up: a group of animals will be administered the compound. Then, the animals will be experimentally infected with dengue virus (as defined in Appendix 1), and blood samples are collected at regular time points to determine if the animals have been protected against infection, or if the viremia is influenced by the prophylactic administration of the compound. A group of animals will not receive the compound, and will be used as controls.
When a compound is evaluated for its therapeutic potential, i.e. to cure infection, animals will first be infected with dengue virus, and subsequently the compound will be administered. During the study, blood is collected at regular time points and tested for the presence or absence of virus.

The primary outcome parameter for antiviral efficacy will be the peak viral load (PVL).

Other, secondary outcome parameters for dengue virus infection that will be evaluated are:
1. the viral RNA load,
2. the duration of viremia,
3. the total amount of virus produced during viremia (AUC; area under the curve)

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

Prophylactic antiviral study:
At the start of the study, the animals will be administered the antiviral compound. The route of administration and the dosage used are based on a PK study with this compound performed in rhesus macaques (Appendix 2). At the same time blood is collected for a zero-value determination. Then, the animals are experimentally infected. The optimal route and inoculum dose are determined in an infection study with this inoculum in rhesus macaques (Appendix 1). At that time point, a group of animals that did not receive the compound will also be infected, and will act as untreated controls in the study. Typically, after infection of the animals, blood will be collected daily for a period of maximally 14 days to monitor the progress of the viral infection and to control for changes in clinical chemistry and hematology parameters. This intensive sampling is necessary because in this period significant and rapid changes in the amount of virus in the blood may occur in untreated animals. During this period of daily sampling the animals will be given liquid foods by means of a probe because the daily anesthesia necessitates fasting of the animals. In this way, the wellbeing of the animals is affected as little as possible. After this period, the frequency of blood collection will be brought down to maximally once every two days. After the untreated control animals have become virus-negative in the PCR for the first time, the groups may be followed for an extra period of 3-4 weeks to confirm absence of the virus and to monitor for sudden re-activations of virus replication in any of the animals. At the end of the study, maximally 6 weeks after the start, the animals will be humanely euthanized and necropsy will be performed for the collection of tissue samples for histopathological and virological tests. The animals will be monitored daily during the study period for general behaviour, appetite, faeces, etc., and at each time-point when the animals are sedated, body weight and body temperature will be measured.

Therapeutic antiviral study:
The set-up of a therapeutic study using the antiviral compound is essentially similar to the prophylactic study. However, in such a study the animals are first infected and then treated with the antiviral compound.

The details of each study, regarding the route of infection, dose used, number of animals used, will be submitted for approval to the AWB.

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

The statistical analysis for the NHP efficacy studies will focus on the peak viral load (PVL) value, which is calculated from the dengue virus infection studies (appendix 1). For PVL a 1 log drop (on log10 scale) under treatment versus vehicle is considered a biological relevant effect.
The design, and more specifically the sample size, of the study will aim to have a minimum of 80% power for detecting this relevant biological effect. Next to the size of the biological effect of interest also the variability in the data drives the required sample size. The true underlying standard deviation (SD) value is currently unknown and will be estimated based on the pilot viral titration study. [1]
Currently we work under the assumption of two potential scenarios, the first where the SD is 0.5 and the second where the SD is 1. For these two scenarios a formal power calculation[2] was performed where the necessary sample size as function of variability and biological effect was assessed under the following assumptions:

- 80% power and 5% type I-error
- One sided testing since we are specifically looking for a directional effect
- 2 group comparison: placebo versus one active dose
- 1:1 randomization ratio between vehicle and active treatment group
- Common variability between the two groups
- Two sample T-test type analysis.

The result is a planned total sample size of 20 or 26 animals for respectively an anticipated scenario with SD of 0.5 and with SD of 1. The actual sample size will be revisited once the viral titration study[1] is finalized where we aim to reliably quantify the actual between animal variability of the parameter of interest and if it changes in function of inoculum used.

B. The animals

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

The experiments will be performed in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) n = 208. All rhesus macaques are purpose bred at our institute, or incidentally they will be obtained from a certified supplier. Both mature male and female animals can be used.

Currently, only two animal models are used in dengue virus research. Mouse models are used in DENV research to investigate various aspects of DENV pathogenesis. However, a major drawback of these rodent models is that the dengue virus infection is done via the highly artificial intracranial route, and that resultant virus replication is low. In contrast, nonhuman primates are the only natural vertebrate hosts besides humans that are susceptible to infection with the four dengue serotypes Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are highly susceptible to DENV infection and best mimic dengue virus infection and pathogenesis in humans (1-11). Additionally, in contrast to other animal species that are used in dengue research, i.e. rodents, macaques have the great advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly (12-14). The latter features, in combination with the susceptibility to DENV infection and the similarity of viremia to the human infection, renders the rhesus macaque an important preclinical animal model, and our animal model of choice, to investigate the efficacy of potential anti-DENV compounds for human use. Furthermore, the body weight of macaques allows the collection of relatively large blood volumes. This is crucial for the antiviral efficacy studies, as the monitoring of viremia necessitates daily sampling for an extended period.

The study design will be a two-stage design where in the first part 10 animals out of N (being either 20 or 26 depending on scenario given in A.) will be randomized to vehicle and highest dose group to be studied in a 1:1 ratio. After completion of this treatment part, an interim analysis will be performed to estimate the drug effect and test for its significance. The second stage will depend on the results of the first with the following potential scenarios:

1. Significant treatment effect detected: the remaining N-10 animals are randomized into the vehicle, highest dose group and minimum two new dose groups to allow estimation of underlying dose response pattern,
2. Estimated treatment effect ≥ 1 log10 drop but not statistically significant: randomize extra X animals into vehicle and highest dose group and randomize the remaining (N-10-X) into minimum two new dose groups to allow estimation of underlying dose response pattern,
3. Estimated treatment effect < 1 log10 drop and not statistically significant: randomize remaining animals into the vehicle and highest dose group to increase precision of estimated treatment effect or, if other study data allow it, randomize the remaining animals into vehicle and a higher dose group than originally planned.

If the power calculation on basis of the results obtained in the first stage of the study indicates that no statistically significant results can be obtained in stage 2 with the addition of extra animals, this is seen as a 'no-go' for the second stage. The study will then be discontinued after the first stage.

Typically, an antiviral efficacy study consists of one control group of animals and one treatment group (max. 2 x 26 = 52 animals). In a period of 5 years we expect to test a maximum of two antiviral compounds, both in a prophylactic and a therapeutic efficacy study.
In total 208 animals are the maximum needed for the efficacy studies over a period of 5 years.
(2 compounds x 2 efficacy studies x 52 animals)

References:

10.2.g

10.2.g

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous flavivirus studies or that have pre-existing antibodies against flaviviruses are not suitable because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

X 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

Although animal models for dengue infection other than nonhuman primates (NHP) are also in use in research for DENV, NHP are the animal model that best mimic infection and pathogenesis in humans. Equally, in contrast to other animal species that are used in biomedical research, like rodents, macaques have the great advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly. This, in combination with the fact that DENV infection of macaques, mimics infection and pathogenesis in humans, renders the rhesus macaque preclinical animal model of choice to investigate the efficacy of potential anti-DENV compounds for human use.

Reduction
This study involves the efficacy testing of antiviral compounds in the dengue virus infection model in rhesus macaques. Because the variability in dengue viral replication kinetics in the macaques will only become available after the completion of the infection studies, the exact number of animals to be used in the studies cannot be provided at this point. Under A we have described the statistical analyses that will be performed on basis of the infection studies. Only the minimum number of animals needed will be used. If possible, studies will be combined. In such a case, one control group will suffice and the total number of animals will be reduced.
Refinement
Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Infection and bleeding take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or virus infection. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.
All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, a standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of dengue-related disease like (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma).

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute.
All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database thus facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relief the pain, if necessary.
During the first 2 weeks of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.
Regular analysis of haematological and clinical chemistry parameters is part of the experiment. During these experiments, the virus load in plasma will also be analysed as primary indicator of infection. These data will also be consulted to determine if changes in behaviour, appetite or stool are clinically relevant. If necessary, judged by the veterinarian, measures will then be taken to treat the animal.
The studies will be performed according the Dutch laws, and will cause no adverse effects on the environment.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

X No

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

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

X 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.

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

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

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

In case of symptoms caused by dengue virus infection, this can result in pain. For this purpose, oral or parenteral analgesia will be administered after consultation with the veterinarian.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort due to virus inoculation
2. Stress because of sedation
3. Reduced food intake due to repeated daily sedations

Explain why these effects may emerge.

1. Intradermal inoculation can cause mild irritation
2. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling and virus inoculation. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
3. Animals will be sedated daily during the first phase of the infection. This will have influence of the appetite

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

1. If irritation occurs, this will be mild. It will therefore not be necessary to take additional measures.
2. Recovery of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
3. Animals will receive tube feeding via gavage. This is applied during sedation for blood collection.

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.

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

In humans, approximately 10% of the dengue infections is clinically relevant. Clinical symptoms are very diverse and sofar there is no biomarker to predict the course of disease on forehand. So far, several dengue infection studies have been described in nonhuman primates. So far, few clinical symptoms related to DENV infection in NHP have been described. Behavioural changes and some clinical signs have been recorded (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma), but none of these signs has been linked to serious DENV disease in macaques. The general condition of the animals will be monitored and registered in a dengue-customized clinical scoring list. If any of these symptoms is found animal caretakers will directly contact the investigator and veterinarian. Together with all available information (haematology, clinical chemistry, general behaviour, additional clinical scoring and virological status) the veterinarian will judge the overall condition of the animal and suggest required follow up.
In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, the animals will be humanely euthanized at an earliest time point.

Indicate the likely incidence.

After DENV infection each animal may become seriously ill. Thus, the percentage is 100%

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative discomfort is estimated as moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

In order to investigate the presence of residual virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage caused by DENV, it is necessary to euthanize the animals

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

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

X Yes

Centrale Commissie Dierproeven

14

Datum 29-09-2017
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20172884

Advies aan CCD

B

Instelling:	Biomedical Primate Research Centre
Onderzoeker:	10.2.e
Project:	Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection
Aanvraagnummer:	AVD20172884
Betreft:	Nieuwe aanvraag
Categoriën:	Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	De aanvraag is inclusief DEC advies ontvangen. De aanvrager is gevraagd een nieuwe NTS te sturen die korter is en beter aansluit bij de handelingen beschreven in de aanvraag. Daarnaast is gevraagd voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 aan te geven waarom de dieren gedood worden. Tot slot is gevraagd waarom voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 geen van de dieren en voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 alle dieren de humane eindpunten zullen bereiken.

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		90	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**
3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		18	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**
3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		208	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**

Er wordt gebruik gemaakt van NHP (citaat):
Rhesus macaques (Macaca mulatta) are highly susceptible to DENV infection and best mimic dengue virus infection and pathogenesis in humans. Additionally, their body weight allows the collection of relatively large blood volumes. This is crucial for experimental infection studies as the monitoring of viremia necessitates daily sampling for an extended period. For these reasons, rhesus macaques are the species of choice for the infection studies described here.
Rhesus macaques are the species of choice for the PK studies described here. In contrast to other animal species that are used in dengue virus research, i.e. rodents, macaques have the advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly. This renders the macaque an important preclinical animal model to investigate the pharmacokinetics of potential anti-DENV compounds for human use.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.
- 3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

- 3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	10.2.g
Maatschappij	11.1

2 DEC advies

DEC-advies	citaten: De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met dengue virus en de grote gelijkenis met de mens wat betreft het verloop van de infectie en de pathogenese. Bovendien vertoont deze diersoort zeer grote fysiologische overeenkomsten met de mens, hetgeen van belang is voor drug metabolisme, farmacokinetiek en mogelijke interacties met de organen/weefsels. De kandidaat antivirale middelen zijn tevoren gekarakteriseerd qua werkzaamheid en toxiciteit in in vitro en in vivo (veelal knaagdieren) modellen. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling van kandidaat antivirale middelen is het echter noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid te onderzoeken in een diermodel waarin de aard en verloop van de ziekte grote overeenkomsten vertonen met de mens. De eventuele nadelige effecten (bijvoorbeeld als gevolg van de interactie met het infectieus agens en de organen/weefsels) van de kandidaat antivirale middelen kunnen in dit diermodel worden bepaald. Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven. Hergebruik wordt altijd overwogen en ook nagestreefd (binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke kwaliteit). Ethische afweging van de DEC: citaat: 1 Rechtvaardigt het testen van nieuwe kandidaat antivirale middelen tegen dengue het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeks modellen. 2 De waarden voor de samenleving zijn gelegen in het ontwikkelen van antivirale middelen tegen dengue. Naar schatting raken jaarlijks 100 miljoen mensen geïnfecteerd met dengue. Bij een half miljoen mensen

leidt de ziekte tot ziekenhuis opname en 25 duizend mensen overlijden ten gevolge van de ziekte. Er is één dengue vaccin beschikbaar dat echter niet even effectief is tegen alle serotypen. Er zijn nog geen antivirale middelen beschikbaar. Met een effectief antiviraal middel kan ziekte en sterfte en in bepaalde doelgroepen infectie voorkomen worden. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn van de samenleving (minder doden, minder zieken).

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze kunnen in lichte mate ziek worden en enige pijn ondervinden door bloedafnames, injecties en infectie met dengue. De dieren ondervinden hiervan matig ongerief.

De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de werking van potentiële antivirale middelen tegen dengue. Daarmee is dit onderzoek informatief en het is de uitdrukkelijke bedoeling om dit te publiceren.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van antivirale middelen die ernstige ziekte en sterfte ten gevolge van dengue infectie kunnen voorkomen. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

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

Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat het ontwikkelen van een effectief antiviraal middel tegen dengue met dengue geïnfecteerde mensen kan genezen en mogelijk infectie met dengue kan voorkomen bij gebruik als profylaxe. Daarnaast kan dit onderzoek meer inzicht geven in de eigenschappen die een antiviraal middel moet hebben om effectief de multiplicatie van het dengue virus te onderdrukken.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek naar door muggen overdraagbare virale infecties, inclusief dengue, en de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor de dengue infectie en voor de PK studies, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor dengue infectie, het vergelijkbare verloop van de infectie en pathogenese

	en de zeer grote fysiologische en anatomische overeenkomsten met de mens. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. De 3V-principes worden gehonoreerd door hergebruik van dieren, en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen (positive reinforcement). Het ongerief is maximaal matig. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven. De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. De te onderzoeken antivirale middelen zijn in gevorderde stadia van ontwikkeling. De kandidaat medicijnen zijn tevoren gekarakteriseerd in in vitro en in vivo (veelal knaagdieren) modellen. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling is het echter noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid te onderzoeken in een diermodel waarin de aard en verloop van de ziekte, alsmede de mogelijke interactie tussen kandidaat antiviraal middel en de organen/weefsels, grote overeenkomsten vertonen met de mens. De effecten van de kandidaat antivirale middelen kunnen in dit diermodel goed worden onderzocht en ook kunnen eventuele nadelige effecten aan het licht komen. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt. De DEC heeft extern advies ingewonnen bij - de aanvrager is om aanvullingen gevraagd Enige tekstuele aanpassingen, aanvullende achtergrond informatie, verdere onderbouwing van de noodzaak om te testen in niet-humane primaten, nadere onderbouwing van het aantal benodigde dieren, nadere specificering van de primaire uitkomstparameters. Tevens werd gevraagd om aanvullende informatie over biotechnische handelingen, milieueffecten, verfijning en humane eindpunten. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag Het DEC advies is Positief Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	11.1
	Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. Een van de DEC leden was betrokken bij de aanvraag. Deze persoon heeft zich teruggetrokken van de vergadering bij de bespreking van de aanvraag en overigens geen aandeel gehad in de afweging en advisering.
11.1	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	10.2.g
Doelstelling Doelstelling	citaat: The ultimate goal is to develop prophylactic and therapeutic intervention strategies for dengue virus infections in humans. The specific aim of this research project is to evaluate safety and efficacy of dengue antiviral compounds in rhesus macaques. Currently, no specific antiviral compounds are available for the treatment of Dengue virus (DENV) infections, or to be used as a prophylaxis. This research program contributes to the worldwide efforts to develop novel DENV antiviral compounds. Ultimately, after extensive in vitro testing, and in vivo evaluation in small animal models, antiviral compound safety and efficacy needs to be demonstrated in a suitable NHP species before they can be evaluated in clinical trials. The dengue antiviral compounds that will be tested at our institute in macaques will be in the final stages of their preclinical development, and require this last validation step In order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species, and that they are effective in animal species that have a drug metabolism and physiology closely resembling humans.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	citaat: The incidence of DENV worldwide has increased 30-fold over the last 50 years. It has been estimated by the WHO that 100 million clinically apparent dengue virus infections occur every year, resulting in 500.000 hospitalizations due to severe dengue, and 25.000 deaths. The rapid spread of DENV to new territories, and its potential to induce high morbidity and mortality in humans clearly shows the necessity for the development of vaccines, and to the requirement of antiviral compounds. Dengue virus vaccine development is hampered by a phenomenon known as 'antibody dependent enhancement' (ADE): infection by one of the four dengue virus seratypes confers lasting protection against homotypic re-infection, but a secondary infection with another serotype is associated with an increased risk of severe dengue disease. ADE is caused by antibodies that bind to the virus, but are incapable of neutralizing the virus. The challenge and difficulty in the development of a dengue vaccine is to avoid ADE elicited by vaccine-induced antibodies. Currently, there is only one dengue virus vaccine available which is directed to all 4 serotypes. For younger children, this vaccine is considered unsafe because of possible vaccine-induced ADE. Therefore, the vaccine is only recommended by the WHO for use in healthy individuals older than 9 years of age that live in endemic areas with high dengue virus burden.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	In het DEC-advies staat: Hoewel de ervaring met het dengue infectie model vrij beperkt is zijn kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven in grote mate aanwezig op het gebied van infectie van non-humane primaten met onder andere door muskieten overdraagbare virussen alsmede de aandacht voor de drie V's op dit gebied. Kennis en kunde worden verder onderbouwd door de wetenschappelijke output en de verworven interne- en externe financiering. 11.1

3V's Vervanging	
	3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates: citaat: Several animal species, primarily rodents and nonhuman primates have been used to study dengue virus infection. Of these different species, NHPs have the advantage that they physiologically and immunologically most closely resemble humans. This has important implications, both for antiviral compound evaluation as well as for the interaction of the host with dengue virus, since these are affected both by the physiology and by the reaction of the innate and adaptive immune system. The proper evaluation of the antiviral compounds requires adequate infection models in NHP, which is the purpose of the studies proposed here.
	3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates: citaat: All compounds have been tested extensively for efficacy and toxicity in in vitro assays. Also, in vivo toxicity studies have been performed in rodents. Only when no side effects or signs of toxicity are found in the rodent model, the compounds will be evaluated in nonhuman primates.
	3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates: citaat: Although animal models for dengue infection other than nonhuman primates (NHP) are also in use in research for DENV, NHP are the animal model that best mimic infection and pathogenesis in humans. Equally, in contrast to other animal species that are used in biomedical research, like rodents, macaques have the great advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly. This, in combination with the fact that DENV infection of macaques, mimics infection and pathogenesis in humans, renders the rhesus macaque preclinical animal model of choice to investigate the efficacy of potential anti-DENV compounds for human use.

Verminderen	
	3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates: citaat: This animal procedure involves the development of a dengue infection model in rhesus macaques for use in antiviral compound efficacy testing. Because of the expected variability in viral replication kinetics between different viral strains or stocks, no statistical support for the number of animals can be provided at this point. Based on the extensive experience with other viral infection models within the institute where this research will be performed, plus the limited experience with dengue infection in NHP and based on available literature, we expect that six animals per group will be sufficient in the first experiment. On the basis of the outcome of the first study the number of animals needed in fellow up experiments can be calculated and less animals may be needed. Only the minimum number of animals needed will be used.
	3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates: citaat: In this animal procedure, the pharmacokinetic profile of anti-dengue compounds is determined in rhesus macaques, before their use in antiviral compound efficacy testing in the same animal species. A group size of 3 animals is the standard group size for PK studies. From previous PK studies, it was concluded that experimental groups of three animals are sufficient to obtain a pharmacokinetic profile of the compounds in blood of macaques. This group size allows us insight in the variance between the individual animals, and at the same time allows us to identify possible outliers. Only the minimum number of animals needed, will be used.
	3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates: citaat: This study involves the efficacy testing of antiviral compounds in the dengue virus infection model in rhesus macaques. Because the variability in dengue viral replication kinetics in the macaques will only become available after the completion of the infection studies, the exact number of animals to be used in the studies cannot be provided at this point. Under A we have described the statistical analyses that will be performed on basis of the infection studies. Only the minimum number of animals needed will be used. If possible, studies will be combined. In such a case, one control group will suffice and the total number of animals will be reduced.

Verfijnen	
	3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates: citaat: Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Infection and bleeding take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or virus infection. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum. All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, the standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of dengue-related disease like (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma). Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute.
	3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates: citaat: Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling or compound administration. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Compound administration and blood sampling take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or compound administration. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum. Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute.
	3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates: Zie Bijlage Dierproeven 3.4.4.1
Wettelijk vereist onderzoek Indien ja, is er sprake van herhaling?	Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates: Animals that will be used in these experiments, might have been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous flavivirus studies or that have pre-existing antibodies against flaviviruses are not suitable because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.	
3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates: Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.	
3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates: Zie Bijlage Dierproeven 3.4.4.1	

Naam proef	**Worden de dieren gedood?**	**Doden volgens richtlijn?**
3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates	Nee	
3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates	HEP: not expected	In humans, approximately 10% of the dengue infections is clinically relevant. Clinical symptoms are very diverse and so far, there is no biomarker to predict the course of disease in advance. Several dengue infection studies have been described in macaques, and few clinical symptoms related to DENV infection have been described. Behavioural changes and some clinical signs have been recorded (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma), but none of these signs has been linked to serious DENV disease in macaques. The general condition of the animals will be monitored and registered in a dengue-customized clinical scoring list. If any of these symptoms is found, animal caretakers will directly contact the investigator and veterinarian. Together with all available information (haematology, clinical chemistry, general behaviour, additional clinical scoring and virological status) the veterinarian will judge the overall condition of the animal and will suggest the required follow up. In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, the animal will be humanely euthanized at an earliest time point.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: Matig	
3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates	HEP: not expected	It is not expected that animals will reach a humane endpoint due to the PK study. However, through intensive monitoring of the animals, deviations in behavior, appetite etc. will be noted quickly. In addition, the animals are weighed at each blood collection. A major weight loss of > 20% relative to the weight at the start of the study is seen as humane endpoint. In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, it will be humanely euthanized.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: Matig	

3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates	HEP: After DENV infection each animal may become seriously ill. Thus, the percentage is 100%	Zie Bijlage Dierproeven 3.4.4.1
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: Matig	

5 Samenvatting

11.1

11.1

11.1 [redacted]

[redacted]

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

15

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020172884
Bijlagen
1

Datum 13 oktober 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 8 september 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection" met aanvraagnummer AVD5020020172884. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 5 oktober 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe, kortere, NTS die beter aansloot bij de aanvraag; de reden van het doden van de dieren voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 en waarom het aantal dieren dat de humane eindpunten zal bereiken verschilt.

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 "Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 december 2017 tot en met 30 november 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf
Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

In het project worden niet humane primaten gebruikt.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie 10.2.g [redacted] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 september 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.

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
namens deze: 10.2.g [redacted]

ir. G. de Peuter [redacted]
Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 december 2017 tot en met 30 november 2022, voor het project "Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection" met aanvraagnummer AVD5020020172884, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Section Head Molecular Virology.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 8 september 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 september 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 5 oktober 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 september 2017, ontvangen op 8 september 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 5 oktober 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	90	Matig	
3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	18	Matig	
3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	208	Matig	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen
Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf.Deze beoordeling zal uiterlijk november 2023

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

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen
Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging
De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.
In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

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

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

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

Beoordeling achteraf
Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

	Inventaris Wob-verzoek W19-02								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS20181326	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	NTS	x							
3	projectvoorstel				x			x	
4	Bijlage dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage dierproeven 2				x			x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	DEC advies				x		x	x	
8	aanvullende vragen				x		x		
9	reactie op vragen				x		x		
10	Advies CCD				x				x
11	Beschikking en vergunning				x		x		

Centrale Commissie Dierproeven

1

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? *Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*	X Ja > *Vul uw deelnemernummer in*	50200
		☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Biomedical Primate Research Centre
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e [redacted]
		KvK-nummer	41146967
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. *Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*	Straat en huisnummer	Lange Kleiweg 161
		Postbus	3306
		Postcode en plaats	2288 GJ Rijswijk
		IBAN	[redacted] 10.2.g
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting Biomedical Primate Research Centre
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	10 [redacted] XDhr. ☐ Mw.
		Functie	10.2.g [redacted]
		Afdeling	10.2.g
		Telefoonnummer	10.2.e [redacted]
		E-mailadres	10.2.e [redacted]
1.5	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	10 [redacted] ☐ Dhr. X Mw.
		Functie	10.2.e en 10.2.g [redacted]
		Afdeling	[redacted]
		Telefoonnummer	[redacted]
		E-mailadres	[redacted].nl

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

2 Over uw aanvraag

2.1	Wat voor aanvraag doet u?	X 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 - 01 - 2018
		Einddatum	31 - 12 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of next-generation rabies-flavivirus combination vaccines	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Evaluatie van een nieuwe vaccinproductietechnologie voor de ontwikkeling van volgende generatie rabiës-flavivirus-combinatievaccins	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	10.2.g
		Postadres	[redacted]
		E-mailadres	10.2.e

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

X Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 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

X Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

X Projectvoorstel

X Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

X 2 bijlages

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	10.2
Functie	10.2.g
Plaats	Rijswijk
Datum	03 - 11 - 2017
Handtekening	10.2.e en 10.2.g

Centrale Commissie Dierproeven

3

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	Provide the title of the project.	Evaluation of a novel vaccine production technology in rhesus macaques

2 Categories

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

- ☐ Basic research
- X 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.

In this project, we will evaluate an innovative technology for the production of vaccines against human pathogens, the Plasmid-Launched Live-Attenuated Vaccine (PLLAV) technology, in rhesus macaques. We will 1) develop a protocol for the administration of vaccines manufactured using this technology, and 2)

will assess the efficacy of PLLAVs targeted to important human viral pathogens.

PLLAV technology

The PLLAV technology is based on a plasmid vector that carries a complete genome of a live-attenuated yellow fever virus that is derived from the YFV-17D vaccine strain. After immunization with this plasmid, named PLLAV-YFVax, live-attenuated YFVs are expressed that subsequently transiently replicate in the vaccine-recipient. Replication then triggers an immune response that is comparable to the response induced by commercially available live-attenuated YFV vaccines. A strong proof-of-concept for this technology has already been obtained in rodent animal models where PLLAV-YFVax protected hamsters against infection with the pathogenic YFV-Asibi strain. PLLAV-YFVax has been used in a small proof-of-concept immunogenicity study in rhesus macaques and induced anti-YFV neutralizing immune responses.

The PLLAV technology is highly versatile because the plasmid vector can easily be adapted to express antigens from other pathogens:

- The prM-E genes of YFV-17D, encoding the matrix (prM) and envelope (E) structural proteins, can be exchanged for prM-E genes of other flaviviruses, like the Japanese encephalitis virus (JEV), resulting in PLLAVs that are capable of inducing an immune response to the respective viruses. This technique is known as 'Chimerivax'. A chimeric PLLAV-YFVax with the prM-E genes of live-attenuated JEV (PLLAV-JEVax) has been constructed using this technique (Figure 1). PLLAV-JEVax induced seroconversion in mice with similar efficiency as the commercial JEV vaccine Imojev®.

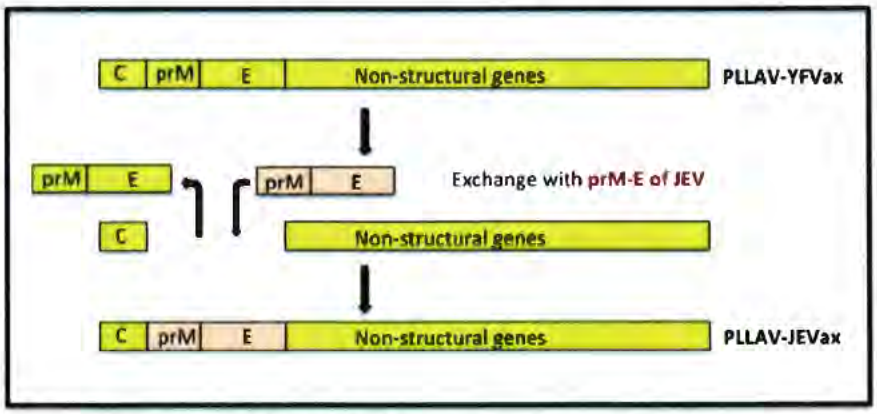


Figure 1. Construction of PLLAV-JEVax using the ChimeriVax technique.

- Additionally, within the viral genome backbone of the PLLAV, either -YFVax or -JEVax, foreign epitopes can be inserted at different sites in the genome, and are co-expressed on the attenuated viruses expressed by the PLLAVs ('dual-target PLLAV').
  In the **RABYD-VAX project** which is described below, both PLLAV-YFVax and PLLAV-JEVax will be adapted so that these constructs will be co-expressing the rabies virus G protein (named PLLAV-YFVax-RABV and PLLAV-JEVax-RABV, respectively). The potential cloning sites for the RABV G protein gene in the YFV/JEV genome are depicted in figure 2.

Figure 2. Cloning sites of foreign epitopes in PLLAV-YFVax and PLLAV-JEVax

The resulting PLLAV-YFVax-RABV induces dual protection against YFV and the classical rabies virus (RABV), while PLLAV-JEVax-RABV is aimed to protect against JEV and RABV infection.

In addition to the extreme flexibility of the technology, PLLAVs combine the benefits of classical DNA vaccines and live-attenuated viruses (Figure 3), but without the disadvantages that are inherent to these vaccine technologies, like:

- Complex, time-consuming, and costly vaccine production,
- Risk of reversal to pathogenicity,
- Lack of immunogenicity, and
- The requirement of a cold chain for vaccine transport and storage.

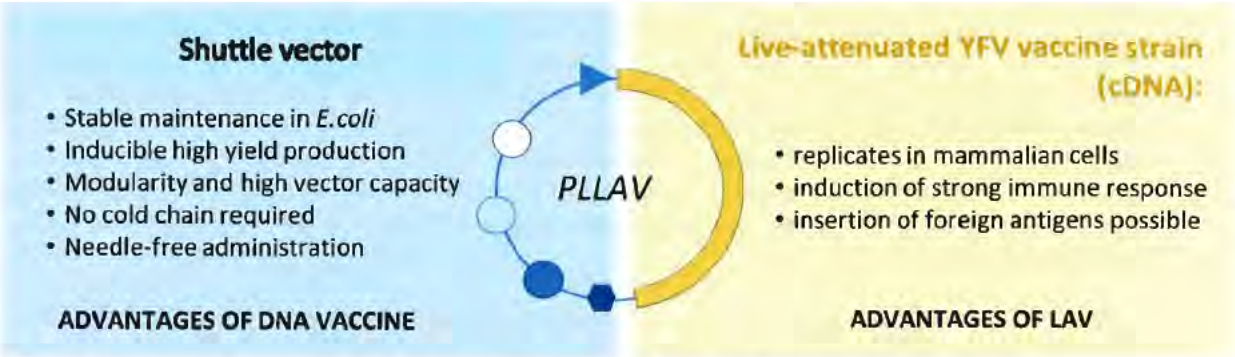


Figure 3. Combined advantages of PLLAV over 'classical DNA and live-attenuated vaccines

Together, its qualities make the PLLAV technology pre-eminently suitable for the production of vaccines for people living in rural areas in tropical countries. Because there is no need for a cold chain for vaccine transport and storage, and because the simpler vaccine manufacturing process will result in lower prices, the PLLAV technology will considerably improve the access to vaccines for this group of people. Additionally, this technique will greatly accelerate the vaccine production in case of sudden disease outbreaks.

The RABYD-VAX project

Vaccines offer a safe and cost-effective way to protect people against infectious diseases. Yet, many poverty-related, infectious diseases escape attempts to develop effective vaccines. These so-called 'neglected tropical diseases (NTDs)' are the most common infections of the world's poor, and almost all of the 1.4 billion people who live below the poverty level (as defined by the World Bank) suffer from one or more of these diseases [1].
Rabies is one of the most important NTDs identified by the World Health Organization. Rabies is a devastating disease for which the mortality rate and burden *per capita* fall disproportionately upon the poorest regions of the world. Rabies is caused by the rabies lyssavirus (RABV) that is transmitted to humans via a bite by infected animals, predominantly dogs. In addition, a number of carnivores, like foxes and raccoons, and bat species also serve as natural reservoirs [2]. In humans, once the first clinical symptoms (such as hydrophobia) have developed, the disease is uniformly lethal, and patients die in great agony.
Disease awareness, responsible dog ownership, and wildlife vaccination are considered to be key components in the control and prevention of rabies infections [2]. However, such strategies are usually not feasible in vast, resource-limited, rabies-endemic regions such as Africa, Latin America, and Asia. A combination of weak veterinary health programs, large stray dog populations, inadequate health monitoring of domestic dogs, and wild animal species that can serve as natural reservoirs for the virus are important hurdles in the decision-making process to implement efficient control measures for rabies transmission [3]. Consequently, rabies still causes 58.000 human deaths every year, mostly in rural areas of Africa and Asia. The majority are children of young age (<15 years), who are at high risk from being bitten while playing with animals, but who are also at risk from receiving the more severe bites

(head wounds) due to their small size. This makes rabies also an important pediatric disease. It is thought that only 3% of rabies cases in humans are reported, and this lack of reliable data has a negative impact on the priority that is needed to control rabies [4,5]. It is estimated that rabies annually causes over 3.7 million disability-adjusted life years (DALY = YLL (*Years of Life Lost*) + YLD (*Years Lived with Disabilities*)), and 8.6 billion USD economic losses in the world's poorest economies [6]. An extra hurdle in the eradication of rabies is that infections with lyssaviruses that are closely related to the classical RABV, for instance Duvenhage virus, Mokola virus or Lagos Bat virus, are often mistakenly diagnosed as caused by RABV. Relatively little is known of these African lyssaviruses, but because of their zoonotic potential they pose a serious threat to humans living in regions of African where these viruses are endemic [7].

Currently, several efficient rabies countermeasures exist, like prophylactic animal and human vaccination, post-exposure prophylaxis with a combination of immunoglobulins, and a vaccine regimen (Rabipur®). Despite, they still fail to prevent human rabies in the main target group: children in endemic areas. The need for a cold chain for transport and storage of vaccines, the necessity of multiple doses, administration by needle, and the overall high cost are the main factors that in combination impede large-scale vaccination campaigns in rabies-endemic regions in the poor, rural areas of Africa, Latin America and Asia. The best strategy to eliminate human rabies is the development of a cheap, stable and potent (one-dose) prophylactic childhood rabies vaccine. This is the primary focus of the EU Horizon2020 RABYD-VAX project.

Yellow fever virus (YFV) and Japanese encephalitis virus (JEV) are also focus of the RABYD-VAX project. They are not NTDs, but are major infectious disease agents for which vaccines and vaccine production can be significantly improved. The YFV is a mosquito-borne flavivirus that causes severe and life-threatening infections with jaundice, systemic bleeding, shock and multi-organ failure. An estimated 900 million people living in 45 countries of Africa and Latin America are at risk of infection. Although live-attenuated prophylactic vaccines [YFV-17D, Stamaril® and YF-Vax®] are available, 200,000 cases of yellow fever still occur annually, resulting in ~30,000 deaths, mainly because of inadequate supplies, the need for trained staff, and the need of a cold chain for vaccine storage [5,8]. The current YFV vaccine production process is also hard-to-scale-up and low-tech, and production capacity cannot react to a rapid depletion of the global emergency stockpile of about 6 million vaccine doses as has been dramatically exemplified by the 2016 yellow fever outbreak in Africa [9]. As a consequence, yellow fever may be impossible to contain when the virus is introduced into African mega-cities such as Kinshasa, or into new vulnerable populations (e.g. in Southern China or other regions of Asia where the *Aedes aegypti* mosquito vector is highly prevalent) [10].
The Japanese encephalitis virus is also a mosquito-borne flavivirus and causes viral encephalitis in many countries of Asia with an estimated 68,000 clinical cases every year. The case-fatality rate among the patients that develop encephalitis is up to 30% and permanent neurologic or psychiatric sequelae are reported in 30-50% of cases. More than 3 billion people are at risk of this infection [11]. A live-attenuated JEV vaccine (Imojev®) is on the market, but this vaccine suffers from the same disadvantages as the YFV vaccines.

The primary aim of the EU Horizon2020 RABYD-VAX project is to develop an efficacious and safe vaccine against rabies. In addition, an inexpensive, easy-to-produce, easy-to-handle, and easy-to-administer in one shot, combination-vaccine against both rabies and YFV (for use in Latin America and Africa), or against JEV and rabies (for use in Asia) would be of great value to the health of people living in areas where these viruses are endemic. As partner in the EU-funded project RABYD-VAX we will evaluate the immunogenicity and protective capacity of vaccines targeted to RABV and YFV, or RABV and JEV that are based on the newly developed PLLAV technology.

3.2 Purpose

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

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?

- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The objectives of this project are to:
1) develop an immunization protocol for use with PLLAV-based vaccines, and to
2) evaluate the efficacy of novel PLLAV-based vaccines in rhesus macaques.

Our institute has a long-standing expertise in conducting vaccine evaluation studies using nonhuman primates. The institute has a large breeding colony of rhesus monkeys that are genetically characterized and are free from specific viruses. The institute has the infrastructure and expertise available to perform the studies safely at the appropriate biosafety level. We have the appropriate immunological assays for assessment of cellular, humoral and innate immune responses against the vaccines.
The institute's long-standing experience with vaccine evaluation studies and pathogenic viruses guarantees that these animal studies will be adequately performed and will be finished within the planned project period.

3.3 Relevance

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

This project is part of a larger research project with the ultimate goal to develop PLLAV-YFVax as universal vaccine platform technology for emerging infectious diseases, not limited to only viral infections.
In the last two decades, the world experienced several outbreaks of virus infections caused by then unknown or less-known viruses, like Ebola, Zika, SARS, MERS, West Nile, Chikungunya, and avian influenza virus. These so-called 'emerging infectious diseases' or 'EIDs' are likely caused by (combinations of) socio-economic, environmental, and ecological factors, like climate change, international travel, changes in land use or agricultural practices etc. [12,13,14].
The abruptness of the outbreaks, that are associated with considerable morbidity and mortality, emphasizes the importance of the development of vaccines and antiviral compounds against EIDs [15,16]. As a result, there is a great demand for vaccine technologies that allow rapid development of safe and easy-to-produce vaccines against emerging infectious agents.

The successful development of PLLAV-YFVax-RABV and PLLAV-JEVax-RABV will be a major step towards the development of PLLAV-YFVax as a universal vaccine platform for EID, but also for other infectious agents.

3.4 Research strategy

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

The overall design of this project consists of the following phases:
1. Optimization of the delivery method for PLLAV-based vaccines in order to most efficiently target the vaccines to the immune system
2. Validation of PLLAV technology by direct comparison with commercial vaccine, and
3. Preclinical evaluation of the efficacy of 'dual-target-virus' vaccines directed to YFV/rabies and JEV/rabies (PLLAV-YFVax-RABV and PLLAV-JEVax-RABV)

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.

In the first phase, we will develop the optimal protocol for the PLLAV delivery in rhesus macaques, with a specific focus on the intradermal delivery of vaccines. Intradermal delivery has gained interest in the recent years. This is driven by the fact that the dermis and epidermis of human skin are rich in antigen-presenting cells suggesting that delivery of vaccines to these layers, rather than to muscle or subcutaneous tissue, should be more efficient and could induce protective immune responses with smaller amounts of vaccine antigen [17]. Indeed, experiments in rodents have shown that protective anti-YFV immune responses can easily be induced by intradermal immunization using minute amounts of vaccine antigen and when applied into the skin dermal layers.
PLLAV-YFVax will be used to develop the best strategy for the delivery of the novel vaccines to the immune system. The animal procedure used in this phase of the project is described in **Appendix 1**:

'Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques'
The selected protocol will subsequently be applied to validate the PLLAV technology by testing the efficacy of the PLLAVs in macaques (**Appendix 2**). In this phase, we will use PLLAVs directed to YFV, JEV and rabies virus, developed in the context of the H2020 RABYD-VAX project, as prototype PLLAVs for the validation of this vaccine technology. Importantly, because the immune correlates of protection for YFV, JEV and RABV are known [5,11,18,19], these efficacy studies only consist of an immunization follow-up phase without the need of an experimental virus infection to control for protection.

During all studies, the animals are closely monitored and investigated for potential adverse health effects of the immunizations. Also, blood samples are taken regularly to measure the vaccine-induced immune responses. The presence of neutralizing antibody titers after the vaccinations, comparable to those induced by commercial vaccines will be used as the prime readout for success.

All vaccines, or vaccine protocols, which will be evaluated in this project meet the criteria drawn up for experiments in non-human primates:

1. The vaccine, or vaccine components must have been tested in cell cultures or in small animal models for absence of toxicity
2. The vaccine strategy used must be novel. The strategy has never been tested in other NHP studies. This may relate to the choice of antigen, the formulation with adjuvant or other carrier, the route of administration, or the manner in which the vaccine is administered.
3. The vaccines cannot be adequately tested for their capacity to induce protective immune responses in other than in nonhuman primate animal models
4. New vaccine candidates will be tested in non-human primates after the immunogenicity of the vaccine has been proven in other animal models

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

The PLLAV technology has already successfully been used in mice and hamsters, but immune responses measured in these small animal models are not necessarily predictive for the outcome of a similar study in humans. The rodent immune system is evolutionary quite divergent from the human system, and as a result the vaccine-induced immune responses in rodents generally have a limited predictive value for vaccine effectiveness in humans [20-23].
A first, small scale study using the PLLAV technology in macaques has been completed at the institute (10.2.g). The intradermal immunization protocol used in that study was comparable to that used in rodents. Using PLLAV-YFVax, a vigorous anti-YFV immune response, comparable to the immune responses detected in control animals that received a commercial YFV vaccine, was induced in one animal. However, immune responses were undetectable in the remaining three macaques. These findings provide a proof-of-concept for the PLLAV technology in macaques, but also emphasize the need for further improvement of the immunization protocol.
To that end, we will systematically investigate several parameters involved in the targeting of the PLLAVs to the dermal skin layer. In contrast to conventional DNA vaccines, the live-attenuated vaccine viruses that are produced by PLLAV-YFVax not only rely on skin cells for the production of live-attenuated viruses, but also on the proximity of small blood capillaries in the skin for their dissemination throughout the body. Parameters that will be evaluated include the vaccine delivery method, the amount of DNA, and the use of carrier molecules for more efficient transcription/translation of the DNA.
Because the rodent skin is much thinner than that of humans this significantly influences the efficiency of intradermal administration and expression of the PLLAVs [24,25]. It is thus vital to evaluate this technology in an animal model whose skin tissue architecture and the composition of the skin immune cell populations are comparable to the human skin. Studies have shown that the skin architecture of macaques is comparable to that of humans, and that immune cell populations is the macaque skin are similar to those in humans [24-26].
The first phase of the project will therefore be used to investigate the delivery of PLLAVs to the skin of macaques. The local replication of the attenuated viruses, and the skin reaction to the vaccine-virus replication, will be analyzed in skin biopsies as prime indicators for effective immunization.
The immunization protocol that induces an optimal combination of virus replication and induction of skin

immune reaction will be selected to study the protective efficacy of the PLLAV-YFVax in macaques. This phase is intended to validate vaccine production by the novel technology by showing the non-inferiority of PLLAV-YFVax against a well-characterized commercially available yellow fever vaccine, Stamaril®. Stamaril® is specifically used in this study as control-comparator because the YFV genome that is used in the PLLAV is derived from this live-attenuated vaccine. In this important validation step of the PLLAV technology, the neutralizing antibody titers against YFV will be the prime read-out, and will be compared to antibody titers induced in macaques immunized with Stamaril®. Importantly, because the immune correlates of protection for YFV are known [5,11,18] this study only consists of an immunization follow-up phase without the need of an experimental YFV infection to control for protection.
This study is essential to prove that the PLLAV vaccine technology protocol using PLLAV-YFVax reliably induces YFV-neutralizing antibody responses that meet, or even exceed, the known immune correlates of protection for humans. For the immune response against YFV, based on the studies in macaques, the Food and Drug Administration approved a log10 neutralization index (LNI) >0.7 as a surrogate for protection against YFV infection. As an alternative, a plaque reduction neutralization test can also be used to replace the LNI [27].
Only when this milestone is reached (LNI >0.7 in majority of animals), the novel dual-target PLLAV-YFVax-RABV and PLLAV-JEVax-RABV will be evaluated in macaques in the final phase of the project. As for the YFV vaccine, the immune correlates of protection for JEV and rabies virus in rhesus macaques are already known. For a rabies vaccine to induce a protective response, neutralizing antibody titers ≥0.5 IU/ml serum will have to be reached, a threshold that is generally accepted as an adequate criterion for a protective immune response against rabies after vaccination [28]. For JEV vaccines, the World Health Organization (WHO) defined the correlate of immunity as a 50% plaque reduction neutralization test (PRTN50) value of ≥1:1. This value is also generally accepted as criterion for a protective immune response for all flavivirus vaccines. Like for the single-target PLLAV-YFVax, assessment of the immune response after immunization of the animals will be sufficient and an experimental infection is not needed.

References to text

1. Hotez, P. (2011). A Handful Of 'Antipoverty' Vaccines Exist For Neglected Diseases, But The World's Poorest Billion People Need More. Health Affairs, 30(6), 1080-1087.
2. WHO (2013). Expert Consultation on Rabies. Second report (pp. 1-150).
3. Arechiga Ceballos *et al.* (2014). Control of canine rabies in developing countries: key features and animal welfare implications. Rev Sci Tech, 33:311-321
4. Knobel, D. L., Cleaveland, S., Coleman, P. G., Fèvre, E. M., Meltzer, M. I., Miranda, M. E. G., *et al.* (2005). Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. Bulletin of the World Health Organization, 83(5), 360-368.
5. Staples, J. E., Gershman, M., and Fischer, M. (2010). Yellow fever vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR, 59, RR-7, 1-22.
6. Hampson, K., Coudeville, L., Lembo, T., Sambo, M., Kieffer, A., Attlan, M., *et al.* (2015). Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. PLoS Neglected Tropical Diseases, 9(4), e0003709
7. Johnson, N., Vos, A., Freuling, C., Tordo, N., Fooks, A. R., and Müller, T. (2010). Veterinary Microbiology. Veterinary Microbiology, 142(3-4), 151-159.
8. Monath, T. P. (2013). 17D Yellow Fever Virus Vaccine. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 89(6), 1225-1225.
9. Barrett, A. D. T. (2016). Yellow Fever in Angola and Beyond-The Problem of Vaccine Supply and Demand. The New England Journal of Medicine, 375(4), 301-303.
10. Wasserman, S., Tambyah, P. A., and Lim, P. L. (2016). Yellow fever cases in Asia: primed for an epidemic. International Journal of Infectious Diseases, 48, 98-103.
11. McArthur, M. A., and Holbrook, M. R. (2011). Japanese Encephalitis Vaccines. Journal of Bioterrorism and Biodefense, Suppl 1(002).
12. Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., and Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. Nature, 451(7181), 990–993.
13. Morse, S. S., Mazet, J. A., Woolhouse, M., Parrish, C. R., Carroll, D., Karesh, W. B., et al. (2012).

Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. The Lancet, 380(9857), 1956–1965.
14. Woolhouse, M. E. J., and Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. Emerging Infectious Diseases, 11(12), 1842–1847.

10.2.g

16. García-Sastre, A., and Mena, I. (2013). Novel vaccine strategies against emerging viruses. Current Opinion in Virology, 3(2), 210–216.
17. Hickling *et al.* (2011) Intradermal delivery of vaccines: potential benefits and current challenges. Bulletin of the World Health Organization 89,221-226.
18. Gotuzzo, E., Yactayo, S., and Cordova, E. (2013). Efficacy and Duration of Immunity after Yellow Fever Vaccination: Systematic Review on the Need for a Booster Every 10 Years. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 89(3), 434-444.
19. Moore, S. M., and Hanlon, C. A. (2010). Rabies-Specific Antibodies: Measuring Surrogates of Protection against a Fatal Disease. PLoS Neglected Tropical Diseases, 4(3), e595.
20. Bolker, J. (2012). Model organisms: There's more to life than rats and flies. Nature, 491(7422), 31–33.
21. Louz, D., Bergmans, H. E., Loos, B. P., & Hoeben, R. C. (2013). Animal models in virus research: their utility and limitations. Critical Reviews in Microbiology, 39(4), 325–361.
22. Smith, D. R., Holbrook, M. R., & Gowen, B. B. (2014). Animal models of viral hemorrhagic fever. Antiviral Research, 112(C), 59–79.
23. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. Viruses, 4(12), 62–82.
24. Avci, P., et al. (2013) Animal models of skin disease for drug discovery. Expert Opin. Drug Discov., 8(3): 331–355.
25. Jung, E.C. and Maibach, H.I. (2014) Animal models for Percutaneous Absorption. In: Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration. p21-30.
26. Adam, I., Rosenbaum, P., Cosma, A., Le Grand, R., and Martinon, F. (2015) Identification of skin immune cells in non-human primates. Journal of Immunological Methods, 426, 42-49.
27. Gotuzzo, E. *et al.* (2013). Efficacy and Duration of Immunity after Yellow Fever Vaccination: Systematic Review on the Need for a Booster Every 10 Years. A. J. Trop. Med. Hyg. 89(13),434-444.
28. DiStefano, D. *et al.* (2013). Immunogenicity of a reduced-dose whole killed rabies vaccine is significantly enhanced by ISCOMATRIX™ adjuvant, Merck amorphous aluminum hydroxylphosphate sulfate (MAA) or a synthetic TLR9 agonist in rhesus macaques. Vaccine, 31(42), 4888-4893
29. Hombach, J. *et al.* (2005) Report on a WHO consultation on immunological endpoints for evaluation of new Japanese encephalitis vaccines, WHO, Geneva, 2–3 September, 2004. Vaccine 23(45), 5205-5211.

McArthur, M.A. & Holbrook, M.R. (2011) Japanese encephalitis vaccines. J. Bioterr. Biodef. 1, 1-16.

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	Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques
2	Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

4

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 1 Type of animal procedure: Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques

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.

For the preclinical vaccine evaluation studies using Plasmid-Launched Live-Attenuated Vaccine (PLLAV) technology-based vaccines in rhesus macaques we will first develop the intradermal immunization protocol for PLLAVs. The quality of the immune responses induced by the PLLAVs not only depends on the intrinsic properties of the vaccine vector constructs, like live-attenuated virus replication and protein expression, but also on the immunization procedure that most efficiently targets the dermis and that will lead to optimal replication of live-attenuated viruses that are launched from the PLLAV.
The PLLAVs will be administered to the macaques via intradermal application. When conventional DNA vaccines are used and applied to the skin, vaccine expression products are taken up by skin dendritic cells, processed, and presented to T-cells in the draining lymphoid organs. In contrast, when a PLLAV-based vaccine is injected in the skin, live-attenuated viruses (LAVs) are first produced that have the ability to transiently replicate in the body. Subsequently, the LAVs disseminate through the body, and stimulate the immune system much like wild-type pathogens do.
The primary parameter that will be evaluated is the detection and quantification of replication of the live-attenuated viruses after immunization with PLLAV- YFVax constructs.
After immunization with PLLAV-YFVax constructs, skin biopsies will be taken at different time points post-immunization, and the LAV replication will be quantified. The immunization protocol that most efficiently targets the dermis and leads to optimal replication of LAVs launched from the DNA construct will be selected for use in the PLLAV immunogenicity/efficacy studies.

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

The first phase of the project is dedicated to the targeting of PLAVVs to the skin, and to improve the delivery of the plasmid-launched live-attenuated viruses. The PLLAV immunization protocol will be developed in 3 successive studies. First, different application methods will be tested using a standard dose of DNA. The method that gives the highest LAV expression will next be used to determine the optimal dose of DNA. Finally, using the optimal application method and DNA dosage, we will evaluate the use of a carrier molecule for improved DNA expression.
The animals will be inoculated with the PLLAV-YFVax construct, or with constructs that express reporter proteins, like Nanoluc(iferase) or mCherry. After inoculation, skin biopsies will be taken from the site of inoculation to quantify the level of expression of the vaccine virus. When PLLAV-reporter proteins constructs are used, the level of reporter gene expression will be measured by PCR. The signal of NanoLuc in skin tissue homogenates will be used to quantify the vaccination efficiency and replication competence of the live-attenuated virus. The tissue distribution of the mCherry reporter protein in fixed tissue sections will be used to determine which tissue compartments and cells are targeted by this immunization method using fluorescence microscopy. After the biopsies have been taken, the wound will be stitched and pain relief will be given. To investigate the kinetics of the vaccine-induced immune responses in combination with the strength of that response, biopsies will be taken at different time points post-immunization to monitor LAV expression, replication, and reporter protein expression in different skin tissue compartments and cells types in time.
In between each sequential study, a go-no go decision point is planned. The criterion to continue with a next study, is that both skin biopsies taken from each individual animal are positive in one of the assays used to detect the LAVs. The PLAVV administration condition to be used in the next study will be selected on basis of the best average replication and expression, in combination the lowest standard deviation of the data. At the end of the study, the animals will be euthanized and a set of tissues (draining lymph nodes, liver, brain, etc.) will be collected to investigate the spread of the PLAVV beyond the site of inoculation. The immunization protocol that combines the targeting to the dermis with the highest level of LAV expression will be selected for the second part of the study in which we will evaluate the efficacy of PLAVVs in rhesus macaques (Appendix 2). The length of each PLLAV expression study is expected to be maximally 2 weeks.

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

Because of the explorative nature of the project no statistical support for the number of animals can be provided. In this first phase of the project we will optimize the immunization protocol using different PLLAV-constructs. The studies will give us first insight in the expression of PLLAV-YFVax constructs in the skin.
The institute has a proven track record for performing vaccination evaluation studies in nonhuman primates. Based on years of experience the number of animals needed for the first studies is estimated, and will be adjusted when necessary. The details of each study, including the exact number of animals that will be used, will be submitted to the AWB.

B. The animals

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

Rhesus macaques (*Macaca mulatta*), adult, m/f, n = 18, purpose bred at the institute, or at another registered breeder or supplier within the EU, in compliance with EU legislation.
The PLAVV-YFVax technology in combination with intradermal application has already shown its potential in rodents. However, findings in small animal models are not necessarily predictive for the outcome of similar studies in humans. The rodent immune system is evolutionary quite divergent from the human system, and as a result the vaccine-induced immune responses in rodents have only a limited predictive value for the vaccine-effectiveness in humans [1-4]. In addition, the rodent skin is much thinner than that of humans and this can significantly influence the intradermal administration and expression of the DNA vaccines [5,6]. For these reasons, PLAVV-YFVax needs to be tested in an animal model, 1) whose immune system is highly comparable to that of humans, and 2) whose skin tissue architecture is comparable to the human skin. The rhesus macaque animal model fulfills these two conditions [1-6] and is therefore selected for the preclinical evaluation of this technology.
In a small-scale study using the PLLAV technology in macaques, 1 out of 4 macaques showed a robust

immune response to the vaccine, providing a clear proof-of-concept for the PLLAV technology in macaques. Though encouraging, this also emphasizes the need for further improvement of the immunization protocol as only 25% of the animals elicited a substantial immune response.
In this project, a study is planned in which we will systematically investigate several vaccine delivery methods, different dosages of DNA, and the use of carrier molecules, in order to develop an optimal PLLAV immunization protocol.
First, we intend to evaluate 4 different application methods, using a standard dose of DNA, and 2 different PLLAV constructs. All will be performed in duplicate. Thus 4 methods x 1 DNA x 2 constructs x 2 = 16 immunizations per animal. We calculate that three animals are minimally needed for this part of the study. Three animals will allow us insight in the variance between the individual animals, and will allow us to identify possible outliers.
From this study, a delivery method will be selected and used for the evaluation of 4 different DNA dosages, using 2 PLLAVs. All immunizations will be performed in duplicate resulting in 1 x 4 x 2 x 2 = 16 immunizations per animal. Again, 3 animals are the minimum number to be used in order to cover between animal variability and to exclude outliers.
Third, the influence of carrier molecules on the immunization procedure will be investigated. Using the selected delivery method and a selected DNA dosage, the use of a carrier molecule to improve PLLAV expression will be evaluated in3 animals.
We anticipate that for the development of the PLLAV delivery protocol minimally 9 animals will be needed. However, because of the highly exploratory nature of the studies with uncertain outcome, 18 animals are calculated for this phase of the project.

References

1. Bolker, J. (2012). Model organisms: There's more to life than rats and flies. Nature, 491(7422), 31–33.
2. Louz, D., Bergmans, H. E., Loos, B. P., & Hoeben, R. C. (2013). Animal models in virus research: their utility and limitations. Critical Reviews in Microbiology, 39(4), 325–361.
3. Smith, D. R., Holbrook, M. R., & Gowen, B. B. (2014). Animal models of viral hemorrhagic fever. Antiviral Research, 112(C), 59–79.
4. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. Viruses, 4(12), 62–82.
5. Avci, P., et al. (2013) Animal models of skin disease for drug discovery. Expert Opin. Drug Discov., 8(3): 331–355.
6. Jung, E.C. and Maibach, H.I. (2014) Animal models for Percutaneous Absorption. In: Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration. p21-30.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

The animals that will be used in the experiments may have been used in previous, unrelated studies. Animals that have been used previously in other flavivirus studies are not suitable for re-use because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. Given the long life expectancy of this species, the animals may be re-used within the legal framework as described in art. 1e of the Law on Animal Experimentation (Wet op de Dierproeven).

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

X 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
With today's state of scientific knowledge, vaccines for human use can still only be developed using animal studies. Recent studies in rodent models have demonstrated the potency of the PLAVV-YFVax technology to induce protection against the yellow fever virus infection. However, because the immune system of rodents is evolutionarily distant from that of humans, these findings have only a limited predictive value for the effectiveness of vaccine-induced immune responses in humans [1-4]. Thus, the predictive value of rodents for the efficacy of DNA vaccines for human use is limited.
The main objective of this project is to develop the PLAVV-YFVax technology, and to ready this technology for pre-clinical development. *In vitro* expression studies, and studies in rodents will play an important role in the early steps of the PLAVV-YFVax development. These studies will be used to assess the potential of novel constructs to produce LAVs, to test their immunogenicity, and to determine the safety in rodent models. But the nonhuman primate animal model, with its immunological and physiological similarities to humans, is most suitable preclinical model for evaluating the effectiveness and safety of this novel vaccine platform. In addition to the abovementioned similarities between NHP and humans, the use of different strategies to immunize animals in the skin requires an animal model with a skin architecture much like that of humans. NHP also fulfill this requirement [5,6].
Reduction
This animal procedure involves the development of a protocol for intradermal injection of PLAVV in the skin of macaques. A small-scale study in macaques already provided proof-of-concept for the PLLAV technology in macaques. Because of the explorative nature of the study no statistical support for the number of animals can be provided. Everything will be done to keep the number of animals that will be used in this phase of the project as low as possible. Each study will be performed in a step-wise design, starting with two animals per parameter. Only when no sufficient results are obtained, extra animals will be used in a second study after approval of the institutional Animal Welfare Body.
Refinement
Immunization will be performed without a needle using needle-free injection methods. Needle-free injection methods are virtually painless and will reduce the risk of trauma because the immunization causes less damage to the tissue. Biopsies will be taken under anesthesia. After skin biopsies are taken, the wounds will be stitched, and analgesia will be administered. The animals are trained to work voluntarily as possible to invasive biotechnical actions such as giving of an anesthetic, or immunization. All observations will be documented and registered in a digital database at the institute. For the experiments, the standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of vaccine-related side-effects.

1. Bolker, J. (2012). Model organisms: There's more to life than rats and flies. Nature, 491(7422), 31–33.
2. Louz, D., Bergmans, H. E., Loos, B. P., & Hoeben, R. C. (2013). Animal models in virus research: their utility and limitations. Critical Reviews in Microbiology, 39(4), 325–361.
3. Smith, D. R., Holbrook, M. R., & Gowen, B. B. (2014). Animal models of viral hemorrhagic fever. Antiviral Research, 112(C), 59–79.
4. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. Viruses, 4(12), 62–82.
5. Adam, I.,Rosenbaum, P., Cosma, A., Le Grand, R., & Martinon, F. (2015) Identification of skin immune cells in non-human primates. Journal of Immunological Methods, 426, 42-49.
6. DeMuth, P.C. *et al.* (2013). Vaccine delivery with microneedle skin patches in nonhuman primates. Nat Biotechnol., 31(12), 1082–1085.

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

The animals will be socially housed with compatible partners to avoid stress of solitary housing. To ensure that the animals can behave themselves as naturally as possible, the institute has an extensive program for enrichment.
Immunizations and blood collections will be performed under sedation. Where necessary, the animals will be given analgesia. If possible, the animals will be trained to voluntary cooperate with the necessary anesthesia. During the experiment, the animals are monitored daily by experienced animal caretakers, and at each sedation time-point the animals will be examined. If there are changes in behavior, appetite, or there is a change of stool, then the veterinarian will be informed, accordingly. Equally, our institute

uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations made during the studies by the trained animal caretakers, like changes in behaviour, appetite and stool, are documented in this database. The use of the database facilitates early recognition of minor changes in these general health parameters, allowing intervention measures taken at an earliest time-point.

Should an animal become seriously ill during the study, then at the same day the animal will be euthanized and necropsy will be performed ("humane endpoint"). When animals are daily sedated for skin biopsies, supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage). This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Thus, the wellbeing of the animals is not additionally affected.
The studies will be performed according to Dutch laws, and the experiments will not cause adverse effects on the environment.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

X No

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

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

X 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.

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

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

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

It is expected that skin biopsies will cause pain. The biopsies will therefore be

performed under anaesthesia, and analgesics will be applied peri-operatively.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort and stress due to recovery from anesthesia.
2. Reduced food intake due to daily sedation
3. Discomfort due to immunizations with PLLAVs.
4. Discomfort due to pain caused by skin biopsies.

Explain why these effects may emerge.

1. Administration of anaesthesia can cause local irritation, and nausea and disorientation can sometimes be observed during recovery from the sedation.
2. When animals are daily sedated, this will have influence of the appetite
3. Immunizations can cause local irritation
4. Skin biopsies cause moderate pain

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

1. If local irritation occurs the severity will be minor, and no extra measures are needed. The recovery from sedation of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
2. Animals will receive tube feeding via gavage.
3. If local irritation occurs due to the immunisations, severity is expected to be minor. Therefore, no extra measures are needed. The site of immunization will be examined each time an animal is sedated. If unexpectedly adverse effects occur, the veterinarian will be informed. The veterinarian will decide to treatment the animal, or, in case of severe illness, if a humane endpoint is reached.
4. Discomfort caused by skin biopsies (< 1 cm) will be moderate. The biopsies will be taken under anaesthesia, and analgesics will be applied peri-operatively.

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.

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

During the study, the animals are monitored twice daily for changes in general behaviour. When sedated, the animals are examined for local adverse effects. If an animal is seriously ill, the veterinarian will be informed. If the animals cannot be treated, this will be seen as a humane endpoint and the animal will be euthanized

Indicate the likely incidence.

The chance that an individual animal will reach a human endpoint due to the PLLAV is very low (<1%), based on studies in rodents

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').

Skin biopsies will cause pain, expected less than 24 hr. This will cause moderate discomfort. All other procedures (immunizations, sedations) will cause minor discomfort. Severe discomfort is avoided by implementation of a humane endpoint.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

In order to examine the spread of the live-attenuated vaccine virus early after infection, it is necessary to collect tissue/organs samples (draining lymph nodes, liver, brain, etc.) for further 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.

X Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre	
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number 2	Type of animal procedure Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques

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.

Analogous to the immunization protocols described for commercially available live-attenuated YFV, JEV and rabies virus (RABV) vaccines, and used in the PLLAV-YFVax studies in hamsters, the set-up of the studies will typically consist of a single immunization followed by a monitoring period in which the development of specific immune responses is monitored. During the follow-up, blood samples will be collected and tested for vaccine-induced humoral and cellular immune responses, as well as the influence of vaccination on the innate immunity.
The first planned study is intended to show the non-inferiority of PLLAV-YFVax against a well-characterized commercially available yellow fever vaccine, Stamaril®, and to confirm that the majority of animals elicit such responses. Stamaril® is specifically used in this study as control-comparator because the YFV genome that is used in the PLLAV is derived from this vaccine. In this important step in the validation of the PLLAV technology, the neutralizing antibody titers against YFV will be the prime read-out, and will be compared to antibody titers induced in macaques using Stamaril®. Only if they are equivalent to, or exceed those induced using Stamaril®, we will continue with the next phase of the project, the evaluation of dual-target vaccines. Importantly, because the immune correlates of protection for YFV are known, this study only consists of an immunization follow-up phase without the need of an experimental YFV infection to control for protection.
Next, the potential of the PLLAV technology for the production of dual-target vaccines will be assessed using PLLAV-YFVax-RABV and PLLAV-JEVax-RABV. Also for these vaccines, neutralizing antibody responses elicited by the vaccine will be decisive for the success of the vaccines.
If the neutralizing antibody titers are equivalent to, or exceed the known immune correlates of protection, the animals from both studies will be euthanized, and blood and organs will be collected to investigate for residual vaccine virus and evaluation of vaccine-induced tissue damage. If titers are lower

than the correlates of protection, the animals will receive a second immunization followed by an extra follow-up period. At the end of the study, the animals will be euthanized, and blood and organs will be investigated.

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

Typically, a PLLAV evaluation study will consist of a single administration followed by a 6-weeks follow-up period. Control group animals will receive commercially available RABV, JEV and YFV vaccines administered by standard vaccination techniques, according the manufacturer's recommendations. The PLLAVs will be given intradermally. The immunization method will be selected on basis of results obtained from the studies described in Appendix 1. For the analysis of the vaccine-induced immune responses, blood samples will be collected pre-vaccination and at regular time-points post-immunization during the follow-up period to monitor the replication of the vaccine construct, to measure clinical chemistry and hematology, and to measure the vaccine-induced B- and T-cell immunity. The animals will be monitored daily during the study period for general behaviour, appetite, faeces, etc., and at each time-point when the animals are sedated, body weight and body temperature will be measured. Also, the sites of immunization are checked for adverse effects due to the injection procedure used. Cell-mediated immunity and innate immune responses will be evaluated by FACS analysis and by Luminex. IgG and IgM production will be measured using ELISA, and the development of neutralising antibody titers will be measured using virus-inhibition assays. The animals will be euthanised at end of the study. Necropsy will be performed and tissue samples will be collected to determine the presence or absence of the vaccine virus after clearance of viremia. Neutralizing antibody responses elicited by the novel vaccines (generally at four to five weeks post-immunization) will be decisive for the success of the vaccine, and will provide a go-no go criterion. If the neutralizing antibody titers are equivalent to, or exceed the known immune correlates of protection, the animals will be euthanized. Blood and organ specimen will then be collected to investigate for residual vaccine virus, and for the evaluation of vaccine-induced tissue damage. If the threshold for protective immune responses is not met at 4-5 weeks post-immunization, the animals may be given a booster immunization. Then, the animals are monitored for another 6 weeks, exactly as is done after the first immunization. At the end of the monitoring, the animals will be euthanized and blood and organs investigated.
The details of each study, regarding the interval between the immunizations, the number and time points of sampling will depend on the actual type of vaccine that is being tested and details will be submitted to the AWB.

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

The number of animals will be based on statistical power analysis. Calculations take into account the number of animals needed to measure whether significant differences between the experimental and commercial vaccine groups can be obtained. Care will be taken that only the minimum number of animals that is needed will be used.
The primary outcome measure will be the induction of neutralizing antibody titers (defined as an antibody level exceeding the established protective level for each virus under investigation). This will be analyzed using (non-parametric) 2 x 2 contingency tables and a one-sided Fisher's exact test.
The exploratory outcome measures include:
- The levels of neutralizing antibody titers induced following vaccination.
- The occurrence of adverse reactions following vaccination. These data will be presented as descriptive statistics.

B. The animals

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

Rhesus macaques (*Macaca mulatta*), adult, m/f, n =120, purpose-bred at the institute, or obtained from another registered breeder or supplier within the EU, in compliance with EU legislation.
Rhesus macaques have been extensively used in YFV, JEV en RABV vaccine research and, importantly, the immune correlates of protection in this nonhuman primate species are well known, and adopted by the WHO and FDA as criteria for vaccine efficacy in humans (see section A). Therefore, the rhesus

macaque is the preferred species for use in this project. The number of animals to be used for each study will be based on results of other studies performed at the institute. If possible, power calculation specific for the experiment will be made to determine the group sizes.
In all, we anticipate to carry out 6 studies using different PLLAVs over a 5-year period, including the first planned study, intended to show the non-inferiority of PLLAV-YFVax against the Stamaril® yellow fever vaccine. Based on the assumption that each study will contain a PLLAV group and a control group, with a maximum of 10 animals per group, the estimated maximum number of animals requested for this phase of the project is 120.
The exact study design will be submitted to the AWB.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

The animals that will be used in the experiments may have been used in previous, unrelated studies. Animals that have been used previously in other flavivirus or rabies virus studies are not suitable for re-use because of the strong immunological cross-reactivity between the different viruses. Given the long life expectancy of this species, the animals may be re-used within the legal framework as described in art. 1e of the Law on Animal Experimentation (Wet op de Dierproeven).

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

X 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
With today's state of scientific knowledge, vaccines intended for use in humans can still only be developed using animal studies. Recent studies in rodent models have demonstrated the potency of the PLLAV-YFVax -technology to induce protection against the yellow fever virus infection. However, because the immune system of rodents is evolutionarily distant from that of humans, these findings have only a limited predictive value for the effectiveness of vaccine-induced immune responses in humans [1-4].
The main objective of this project is to develop the PLLAV-YFVax technology for the production of vaccines, and to ready this technology for pre-clinical development. Rodent models will play an important role in the early steps of the PLLAV-YFVax development, but the nonhuman primate animal model, with its immunological and physiological similarities to humans, is the most suitable preclinical model for evaluating the effectiveness and safety of this novel vaccine platform
Reduction
Statistical calculations for the number of animals per vaccine group will be based on the results of published studies in macaques using commercial vaccines for YFV, JEV, and RABV. This power analysis will give the minimum number of animals required for a statistically valid experimental design. Furthermore, we aim to evaluate different vaccine candidates in a single experiment, so that a single control group can be used and the number of animals needed can be reduced significantly.
Refinement
In case of YFV, JEV, and RABV vaccines, the immune correlates of protection in macaques are known. This makes an experimental infection with these viruses after immunization superfluous, and thus, viral challenge is not a part of the studies. This significantly reduces the discomfort caused to the animals by the experimental procedures.
Immunization will preferentially be performed without a needle using needle-free methods. These methods are virtually painless and may reduce trauma because the immunization causes less damage to the tissue. The immunizations and blood collections will be performed under sedation, and at the same time body temperature and body weight will be measured. The animals are trained to comply voluntarily

as much as possible with invasive biotechnical procedures such as giving of an anesthetic or immunization.
During the study, the animals will be monitored daily by experienced animal caretakers, and at each sedation time-point the animals will be examined. Changes in behavior, appetite, appearance etc. will be documented. These, including changes in blood parameters, will be used to prepare a clinical score list for use in future PLLAV-related studies.
If an animal shows behavioral changes, weight loss, or illness it will be decided in consultation with the veterinarian whether treatment is needed. In case of severe illness, an animal it will be taken directly off the protocol and will be euthanized to prevent further distress.

1. Bolker, J. (2012). Model organisms: There's more to life than rats and flies. Nature, 491(7422), 31–33.
2. Louz, D., Bergmans, H. E., Loos, B. P., & Hoeben, R. C. (2013). Animal models in virus research: their utility and limitations. Critical Reviews in Microbiology, 39(4), 325–361.
3. Smith, D. R., Holbrook, M. R., & Gowen, B. B. (2014). Animal models of viral hemorrhagic fever. Antiviral Research, 112(C), 59–79.
4. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. Viruses, 4(12), 62–82.

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

The animals will be socially housed with a compatible partner to avoid stress of solitary housing. To ensure that the animals can behave as naturally as possible, the institute has an extensive program for enrichment (http://www.bprc.nl/en/welfare/).
During the study, the animals are monitored daily by experienced animal caretakers, and at each sedation time-point the animals will be examined. If there are changes in behavior, appetite, or there is a change of stool, then the veterinarian will be informed, accordingly. Should an animal become seriously ill during the study this is considered a humane endpoint. The animal will then be euthanized the same day and necropsy will be performed.
The studies will be performed according to Dutch laws, and it is not expected that the experiments will have adverse effects on the environment.

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.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

X No

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

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

X 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?

X No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort due to administration of vaccines
2. In humans, the commercially available live-attenuated vaccines for YFV and JEV often cause discomfort like fever, headache, muscle pains, nausea and local irritation. In addition, the commercially available rabies vaccine, Rabipur, also causes lymphadenopathy, dizziness, and skin reactions. No data are available related to similar side effects in macaques, but given the relatedness between humans and monkeys, the latter may also suffer from these vaccine-related side effects.
3. Stress because of sedation and recovery.

Explain why these effects may emerge.

1. Administrations can cause local irritation
2. Replication of live-attenuated vaccine viruses is necessary for an optimal immune response. However, LAVs are not fully harmless and can thus induce mild disease symptoms
3. Animals will be repeatedly sedated for vaccine delivery and blood sampling. Nausea and disorientation can sometimes be observed during recovery from the sedation.

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

1. If local irritation occurs the severity will be minor. Therefore, no extra actions are needed.
2. During the study the animals will be monitored daily by experienced animal caretakers, and at each sedation time-point the animals will be examined. If there are changes in behavior, appetite, or there is a change of stool, then the veterinarian will be informed, accordingly. If side effects occur, they will cause limited discomfort for a limited period of time. However, should an animal become seriously ill during the study, then at the same day the animal will be euthanized to prevent severe discomfort.
3. Animals will recover in their home cage, separated from the cage mate. Recovery and reintroduction of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.

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.

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

Because serious side effects due to YFV, JEV or RABV live-attenuated vaccines have not been described in macaques, it is not possible to provide clear criteria to define a humane endpoint. However, through intensive monitoring of the animals after immunization deviations in behaviour, appetite, etc. will be

noticed quickly. In addition, the animals are weighed at each blood sampling. A large weight loss of > 20% relative to the weight at the start of the study can be considered a humane endpoint. If changes in behavior are noticed, or a large weight loss is monitored, the veterinarian will be consulted. The veterinarian will decide if the animal has reached a humane endpoint and needs to be euthanized.

Indicate the likely incidence.

All animals will be immunized with a live-attenuated vaccine, either one of the commercially available vaccines, or those launched from the new PLLAV platform. However, the risk that an animal reaches the criteria for a humane endpoint is very low (< 1%).

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative discomfort will be minor.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

In order to investigate the presence of residual vaccine virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage due to the vaccine virus, it is necessary to euthanize the animals. This may not be the case in all experiments. If sufficient data are obtained, the animals from subsequent studies need not to be euthanized and can be re-used in other experiments after the vaccine virus has been cleared. The latter decision will be communicated and discussed with the AWB.

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

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

X Yes

Centrale Commissie Dierproeven

6

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020171326
Bijlagen
2

Datum 11 januari 2018
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.g

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 6 november 2017. Het gaat om uw project "Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020171326. 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.

Datum:
11 januari 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020171326

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
11 januari 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020171326

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	10.2.e
Functie:	10.2.g
Afdeling:	10.2.g
Telefoonnummer:	010.2.e
E-mailadres:	10.2.g

Datum:
11 januari 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020171326

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

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 januari 2018
Geplande einddatum:	31 december 2022
Titel project:	Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines
Titel niet-technische samenvatting:	Evaluatie van een nieuwe vaccinproductietechnologie voor de ontwikkeling van volgende generatie rabiës-flavivirus-combinatievaccins
Naam DEC:	10.2.g
Postadres DEC:	10.2.g
E-mailadres DEC:	10.2.e

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.287,-
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

Datum:
11 januari 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020171326

Ondertekening

Naam:	10.2.e
Functie:	10.2.g
Plaats:	Rijswijk
Datum:	3 november 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020171326
Bijlagen
2

Datum 11 januari 2018
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 11 januari 2018
Vervaldatum: 10 februari 2018
Factuurnummer: 171326

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5020020171326	€ 1.287,00

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

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD502000020171326

2. Titel van het project: Evaluation of a novel vaccine production technology in rhesus macaques.

3. Titel van de NTS: Evaluatie van een nieuwe vaccinproductietechnologie in resusapen

4. Type aanvraag:
   - ✓ nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC: 10.2.g
   - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e
   - e-mailadres contactpersoon:

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ✓ ontvangen door DEC: 07-04-2017, 18-09-2017, 27-10-2017
   - ✓ aanvraag compleet: 07-04-2017
   - ✓ in vergadering besproken: 12-04-2017 en 18-10-2017
   - ✓ anderszins behandeld: 30-10-2017 tot 01-11-2017 via email correspondentie tussen DEC leden
   - ✓ termijnonderbreking(en): van 13-04-2017 tot 18-09-2017 en 23-10-2017 tot 27-10-2017
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ✓ aanpassing aanvraag: 18-09-2017 en 27-10-2017
   - ✓ advies aan CCD: 06-11-2017

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
   De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend bij de DEC.

8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
   - Datum
   - Plaats
   - Aantal aanwezige DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager
   - Gestelde vraag / vragen
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum: 13-04-2017 en 23-10-2017.
   - Gestelde vraag/vragen: Enige tekstuele aanpassingen, nadere toelichting omtrent hoofddoelstelling, de te gebruiken vaccin technologie, fasering van de studies in bijlage 1, nadere onderbouwing van het benodigde aantal dieren. Tevens werd gevraagd om aanvullende informatie over biotechnische handelingen en humane eindpunten. Na aanpassing van de tekst werd bij een tweede bespreking verdere uitleg gevraagd over het aantal benodigde dieren per test groep in bijlage 1 en de go/no go momenten voor studies beschreven in bijlage 1 en 2.
   - Datum antwoord: 18-09-2017 en 27-10-2017.
   - Verstrekt(e) antwoord(en): Het projectvoorstel is aangepast in het format projectvoorstel (nadere toelichting hoofddoelstelling en beschrijving vaccin platform), de NTS (beschrijving doelstelling project, opbrengsten), bijlage 1 (fasering studies, benodigde aantal dieren) en bijlage 2 (aanpassing in biotechnische handelingen). Naar aanleiding van de vragen bij de tweede bespreking is in bijlage 1 het aantal benodigde dieren aangepast waardoor de variatie tussen de dieren beter bepaald kan worden en een betere selectie van de optimale toedieningsmethode kan plaats vinden. Tevens zijn in bijlage 1 en bijlage 2 de go/no go momenten nader gespecificeerd.
   - De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.
   - Aard expertise
   - Deskundigheid expert
   - Datum verzoek
   - Strekking van het verzoek
   - Datum expert advies
   - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen statistische analyse, de immunologie, virologie, vaccin onderzoek, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming. De DEC heeft ruime ervaring met het beoordelen van vaccin onderzoek in niet-humane primaten.

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.
   Een van de DEC leden was betrokken bij de aanvraag. Deze persoon heeft zich teruggetrokken van de vergadering bij de bespreking van de aanvraag en overigens geen aandeel gehad in de afweging en advisering.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. In dit project wordt een nieuw vaccin platform, namelijk “Plasmid-Launched Live-Attenuated Vaccine (PLLAV)” geëvalueerd op het vermogen om een beschermende immuun respons in niet-humane

primaten te induceren. Het voorgestelde onderzoek bestaat uit drie fasen, te weten 1) optimaliseren van de toedieningswijze voor dit vaccin platform, 2) validatie van de PLLAV technologie door vergelijking met een commercieel vaccin dat reeds gebruikt wordt tegen gele koorts en 3) bepalen van de effectiviteit van nieuwe PLLAV combinatievaccins tegen rabiës samen met gele koorts of rabiës samen met Japans encefalitis. Het te gebruiken diermodel voor het uitvoeren van fase 1 is beschreven in bijlage 1. Het te gebruiken diermodel voor fase 2 en 3 is beschreven in bijlage 2. De subdoelen sluiten logisch aan bij het hoofddoel en vormen met elkaar een samenhangend geheel. Na eerst de toedieningswijze van het vaccin geoptimaliseerd te hebben wordt dit vervolgens vergeleken met een bestaand vaccin en daarna worden de mogelijkheden geëxploreerd voor een bredere toepassing als combinatie vaccin tegen twee verschillende pathogenen.
De handelingen die de dieren zullen ondergaan en het verwachte ongerief zijn duidelijk omschreven en de uitkomsten uit dit experiment zijn helder en meetbaar. Het aantal dieren dat gebruikt zal worden is realistisch ingeschat en voor zover mogelijk statistisch onderbouwd. De klinische eindpunten zijn duidelijk gedefinieerd.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorie, te weten ‘translationeel of toegepast onderzoek’, sluit aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag wordt een nieuw vaccin platform getest in resus makaken op veiligheid en het vermogen om een beschermende immuun respons op te wekken tegen rabiës, gele koorts en Japans encefalitis. Tevens wordt aangetoond of combinatie vaccins op PLLAV basis effectief en efficiënt kunnen zijn, hetgeen naast de translationele toepassing ook van wetenschappelijk belang is. Het immuunsysteem van resus apen vertoont belangrijke overeenkomsten met dat van de mens, waardoor de uitkomsten een goede indicatie geven over mogelijke bijwerkingen en immunogeniciteit in de mens. Bovendien vormen de in humane primaten opgewekte immuun responsen door de WHO en de FDA erkende criteria voor vaccin effectiviteit bij de mens.

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 om de effectiviteit van nieuwe combinatievaccins tegen rabiës /gele koorts ofwel rabiës/Japans encefalitis te testen op veiligheid en effectiviteit in resus apen. De ontwikkeling van een goed en goedkoop vaccin tegen rabiës heeft de hoogste prioriteit in dit project. Het aantal rabiës gevallen wordt zwaar onderschat door gebrek aan rapportage, men denkt dat de 58.000 dodelijke slachtoffers die jaarlijks gerapporteerd worden slechts 3% van het werkelijke aantal slachtoffers is. Nieuwe vaccins tegen gele koorts en Japans encefalitis zijn dringend nodig omdat de huidige vaccins (op basis van verzwakt virus), hoewel redelijk effectief, inherente problemen hebben. Ten eerste is het productieproces niet goed op te schalen, waardoor de levering achter blijft bij de vraag. Ten tweede moeten de vaccins koud bewaard blijven tijdens het transport, wat in landen met een minder goed wegennet vrijwel onmogelijk is. De te testen combinatievaccins zijn goedkoop, makkelijk te produceren en hoeven niet koud te blijven tijdens transport. Het vaccin platform dat gebruikt wordt in deze aanvraag is niet alleen toepasbaar voor vaccins tegen rabiës, gele koorts en Japans encefalitis, maar kan ook gebruikt worden voor vaccins tegen diverse andere pathogenen. Daarenboven wordt met deze strategie met 1 vaccin bescherming tegen twee verschillende pathogenen bereikt. Vaccins die getest gaan worden in dit model zijn innovatief en kunnen niet in een andere diersoort worden getest omdat die modellen niet voorspellend zijn voor

werking van deze vaccins in de mens.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)* De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van nieuwe vaccins tegen rabiës, gele koorts en Japans encefalitis zijn te beschermen personen, de proefdieren en het onderzoeksveld.

   Het belang voor de samenleving is dat het aantal dodelijke slachtoffers en zieken door rabiës, gele koorts en Japans encefalitis wordt teruggedrongen. Goedkope en betrouwbare vaccins zijn daarvoor essentieel. Dergelijke vaccins die bovendien niet koud bewaard hoeven te worden zijn met name in landen met minder goede voorzieningen of weinig financiële middelen van groot belang voor verbeteren van de volksgezondheid. Verbetering van de gezondheid zal ook leiden tot sociaal maatschappelijke en financieel economische voordelen.

   Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen stress ondervinden, kunnen ziek worden en soms enige mate van pijn ondervinden. De dieren zullen worden gedood in het kader van de proef.

   Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s). Dit onderzoek kan leiden tot meer inzicht in de immunogeniciteit van vaccins gebaseerd op het PLLAV platform en over welke toedieningswijze het meest geschikt is voor dit soort vaccins.

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

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. Dit onderzoek zal worden uitgevoerd binnen een internationaal consortium in het kader van een door de EU gehonoreerd project. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven blijkt uit de jarenlange ervaring met het uitvoeren van vaccin onderzoek in makaken en de aandacht voor toepassing van vermindering en verfijning bij de dierproeven.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. Belangrijke voorafgaande studies zijn reeds gedaan in knaagdiermodellen. De gekozen aanpak bestaat uit 1) optimaliseren van de toedieningswijze, 2) gebruik van de beste toedieningswijze voor de evaluatie van het nieuwe vaccin platform tegen een van de huidige vaccins, 3) verdere evaluatie van het vaccin platform voor geschiktheid als combinatie vaccin tegen twee pathogenen. 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 leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor

voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden).*

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

Het experiment wordt uitgevoerd met niet-humane primaten, namelijk de resus aap (*Macaca mulatta*). De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de nauwe overeenkomsten tussen het immuunsysteem van de resusaap en de mens, inclusief de typen afweercellen in de huid. Eerdere experimenten hebben aangetoond dat de sterkte van de door vaccinatie opgewekte immunologische responsen tegen de hier te testen virussen voorspellend zijn voor de beschermende werking van het vaccin in mensen. Het is daarvoor belangrijk dat het immuunsysteem van de diersoort waarin het vaccin getest wordt zo veel mogelijk overeenkomt met dat van de mens.
Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt, mits de voorafgaande experimenten niet kunnen interfereren met de huidige proefuitkomsten. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De huisvesting en verzorging voldoen ten volle aan de vereisten in bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief is op basis van ervaring met voorgaande vaccin studies correct als matig ingeschat voor de experimenten beschreven in bijlage 1 en licht voor de experimenten beschreven in bijlage 2 en zal worden veroorzaakt door de vaccinaties en de huidbiopten en een beperkt aantal bloedafnames die van een aantal dieren zullen worden afgenomen. De dieren die gebruikt zullen worden voor de experimenten zijn speciaal voor dit doel gefokt, en zullen als sociaal compatibel duo worden gehuisvest.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de toediening van teststof en herhaalde sedatie. Bij de dieren waarin het vaccinatieprotocol wordt getest wordt meerdere keren een huidbiopt genomen. Dit zal niet leiden tot blijvend letsel. De dieren worden aan het einde van de studie geëuthanaseerd om te kijken naar aanwezigheid van het vaccin-virus in inwendige organen. Dieren die gebruikt worden om de effectiviteit van het vaccin te testen zullen aan het einde van het experiment worden geëuthanaseerd om te kijken naar aanwezigheid van vaccin-virussen in inwendige organen en eventuele schade aan de organen. Indien gedurende de loop van het project reeds voldoende informatie omtrent verspreiding van het virus en veiligheid zijn verkregen zal euthanasie niet meer nodig zijn en zullen de dieren terug keren naar de

oorspronkelijke toestand, qua gezondheid en welzijn. Dit zal worden afgestemd met de IvD.

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. Humane eindpunten zijn gebaseerd op het waarnemen van lokale veranderingen op de toedieningsplek, veranderingen in gedrag, eetlust en gewicht. Op basis van de literatuur zijn geen ernstige effecten van de vaccins te verwachten. Echter de dieren worden zorgvuldig geobserveerd en humane eindpunten worden toegepast om verder ongerief te voorkomen. Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de kans dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken adequaat ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Er is geen *in vitro* model waarin de effectiviteit van vaccins kan worden getest, daarom is gebruik van proefdieren noodzakelijk. De toedieningswijze van het vaccin (via naaldvrije methoden) wordt geoptimaliseerd in apen omdat die qua huidstructuur en immuunsystemen het meest op de mens lijken. Hierdoor is de uitkomst van experimenten met humane vaccins in resusapen het meest voorspellend voor de werking in mensen.

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. De proefopzet wordt telkens gebaseerd op de concrete experimentele vraagstelling. Het aantal te gebruiken dieren per behandelgroep wordt voor zover mogelijk bepaald met behulp van statische powerberekeningen op basis van de verwachte effect grootte van de primaire uitkomstparameter en spreiding van de data. Het aantal dieren dat nodig is voor het optimaliseren van de toedieningswijze is tot een minimum beperkt en wordt door de DEC geaccepteerd.

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 uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren die goed aan mensen gewend zijn, de dieren zijn bovendien getraind om mee te werken aan bepaalde dier technische handelingen, waardoor ze minder stress ervaren. Sedatie en pijnbestrijding zal worden toegepast.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

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

worden gedood om de hoeveelheid en de verdeling van het virus over het lichaam te bepalen. Van de dieren waarbij de effectiviteit van de nieuwe vaccins wordt bepaald wordt een deel gedood aan het einde van het experiment om aanwezigheid van virussen in inwendige organen en mogelijke schade aan de weefsels te bepalen. Daarnaast worden dieren ge-euthanaseerd wanneer humane eindpuntcriteria worden bereikt, dit om verder ongerief te voorkomen. Er wordt een passende dodingsmethode gebruikt (conform bijlage IV van de richtlijn).

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. Hergebruik wordt altijd overwogen en ook nagestreefd (binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke kwaliteit).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het testen van innovatieve combinatievaccins tegen rabiës plus gele koorts of Japanse encefalitis het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren.

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

   De waarden die voor de samenleving in het geding zijn zijn gelegen in het ontwikkelen van nieuwe goedkopere en makkelijker te distribueren combinatievaccins tegen hondsdolheid plus gele koorts of hondsdolheid plus Japans encefalitis. Naar verwachting leidt dit tot vermindering van het aantal ziektegevallen en doden als gevolg van infectie met bovenstaande virussen. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor de kwaliteit van leven van de mensen. Gezien de ernst van de ziektes en het aantal aangedane personen wordt het belang voor de samenleving als groot ingeschat. Het belang wordt verder ondersteund door het feit dat dit onderzoek door de EU wordt gefinancierd.

   Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze kunnen hierdoor mogelijk ziek worden en enige pijn ondervinden door beperkte chirurgische ingrepen, bloedafnames en injecties. De dieren ondervinden hiervan licht tot matig nadeel.

   De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de toepasbaarheid van vaccins gebaseerd op het PLLAV platform ter voorkoming van rabiës in combinatie met ofwel gele koorts of Japans encefalitis. Ook kunnen de resultaten leiden tot een beter begrip omtrent extrapoleerbaarheid naar de mens. Daarmee is dit onderzoek innovatief, informatief en het is de uitdrukkelijke bedoeling om dit te publiceren. Gezien de mogelijkheden tot een bredere toepassing

van dit vaccin platform wordt het belang als groot ingeschat.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot de ontwikkeling van nieuwe vaccins die gemakkelijk gebruikt kunnen worden voor grootschalige bestrijding van hondsdolheid in mensen (en wellicht ook in honden), gele koorts en Japans encefalitis. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

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

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

Het onderzoek is van groot belang voor miljoenen mensen in verschillende delen van de wereld. Het aantal doden veroorzaakt door infectie met een van de drie virussen waar de vaccins tegen ontwikkeld worden kan met behulp van een vaccinatieprogramma gebaseerd op de nieuwe vaccins aanmerkelijk gereduceerd worden. Bovendien kan het hier te testen vaccin platform in de toekomst mogelijk ook worden toegepast voor bescherming tegen andere pathogenen.

De expertise voor het verrichten van deze experimenten is beschikbaar binnen de instelling en bij de betrokken onderzoekers. De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek naar vaccins tegen verschillende virussen. De vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten is ruimschoots aanwezig. Door de zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens zullen de uitkomsten van dit onderzoek een betrouwbare voorspelling geven voor de werking van het vaccin in mensen. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. De 3V-principes worden gehonoreerd door hergebruik van dieren, en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen (training onder beloning). Het ongerief is maximaal matig. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling is het noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid van de kandidaat vaccins te onderzoeken in een diermodel dat grote overeenkomsten vertoont met de mens. De effecten van de kandidaat vaccins kunnen in dit diermodel goed worden onderzocht en ook kunnen eventuele nadelige effecten aan het licht komen.

Gezien de grote voordelen van het beschikbaar komen van een goedkoop, breed toepasbaar en effectief combinatie vaccin platform tegen diverse ziekteverwekkers is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

   De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

   ✓ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

   ✓ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd

met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus. De belanghebbende die lid is van de DEC heeft geen aandeel gehad in de totstandkoming van dit advies.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma’s zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.

8

10.2.e

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: maandag 29 januari 2018 13:22
Aan: 10.2.e
CC: 10.2.e
Onderwerp: Aanhouden AVD5020020171326

Categorieën: Dossier: 10.2.e

Geachte 10.2.e

Op 06-11-2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines" met aanvraagnummer AVD5020020171326. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

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

Onduidelijkheden
- Het is in bijlage 3.4.4.1 onduidelijk hoe vaak een huidbiopt wordt genomen en hoeveel tijd tussen de verschillende biopten zit. Graag dit verhelderen.

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

Opsturen binnen veertien dagen
Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Geachte mevrouw, heer,

Naar aanleiding van uw verzoek om aanvullende informatie betreffende onze aanvraag projectvergunning Dierproeven, AVD5020020171326, stuur ik u de gevraagde aanvullende informatie.

Uw vraag:
Het is in bijlage 3.4.4.1 onduidelijk hoe vaak een huidbiopt wordt genomen en hoeveel tijd tussen de verschillende biopten zit. Graag dit verhelderen.

Antwoord:

- Bijlage 3.4.4.1 (Appendix 1): per dier zullen maximaal op 4 tijdstippen 2 huidbiopten worden genomen van verschillende plaatsen op de rug. De tijd tussen de afname van verschillende huidbiopten zal minimaal 2 dagen zijn. De exacte tijdstippen, aantal en tijd tussen de afnames zullen per studie met de IvD worden besproken.

Ik hoop dat ik u voldoende geïnformeerd heb, en zie uw reactie graag tegemoet.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven

10

Advies aan CCD

B

Datum 22 februari 2018

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20171326

Instelling:	Biomedical Primate Research Centre
Onderzoeker:	10.2.e
Project:	Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines
Aanvraagnummer:	AVD20171326
Betreft:	Nieuwe aanvraag
Categorieën:	Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	11.1			
Naam proef	**Diersoort**	**Stam**	**Aantal dieren**	**Herkomst**
3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		18	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**
3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		120	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**

Citaat: In order to investigate the presence of residual vaccine virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage due to the vaccine virus, it is necessary to euthanize the animals. This may not be the case in all experiments, If sufficient data are obtained, the animals from subsequent studies need not to be euthanized and can be re-used in other experiments after the vaccine virus has been cleared. The latter decision will be communicated and discussed with the AWB.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.
- 3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	10.2.g
Maatschappij	11.1

2 DEC advies

DEC-advies	Het experiment wordt uitgevoerd met niet-humane primaten, namelijk de resus aap (Macaca mulatta). De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de nauwe overeenkomsten tussen het immuunsysteem van de resusaap en de mens, inclusief de typen afweercellen in de huid. Eerdere experimenten hebben aangetoond dat de sterkte van de door vaccinatie opgewekte immunologische responsen tegen de hier te testen virussen voorspellend zijn voor de beschermende werking van het vaccin in mensen. Het is daarvoor belangrijk dat het immuunsysteem van de diersoort waarin het vaccin getest wordt zo veel mogelijk overeenkomt met dat van de mens. Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt, mits de voorafgaande experimenten niet kunnen interfereren met de huidige proefuitkomsten. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven. Ethische afweging van de DEC: Citaat: Rechtvaardigt het testen van innovatieve combinatievaccins tegen rabiës plus gele koorts of Japanse encefalitis het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren. De waarden die voor de samenleving in het geding zijn zijn gelegen in het ontwikkelen van nieuwe goedkopere en makkelijker te distribueren combinatievaccins tegen hondsdolheid plus gele koorts of hondsdolheid plus Japans encefalitis. Naar verwachting leidt dit tot vermindering van het aantal ziektegevallen en doden als gevolg van infectie met bovenstaande virussen. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor de kwaliteit van leven

van de mensen. Gezien de ernst van de ziektes en het aantal aangedane personen wordt het belang voor de samenleving als groot ingeschat. Het belang wordt verder ondersteund door het feit dat dit onderzoek door de EU wordt gefinancierd.
Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren
handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze kunnen hierdoor mogelijk ziek worden en enige pijn ondervinden door beperkte chirurgische ingrepen, bloedafnames en injecties. De dieren ondervinden hiervan licht tot matig nadeel.
De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de toepasbaarheid van vaccins gebaseerd op het PLLAV platform ter voorkoming van rabiës in combinatie met ofwel gele koorts of Japans encefalitis. Ook kunnen de resultaten leiden tot een beter begrip omtrent extrapoleerbaarheid naar de mens. Daarmee is dit onderzoek innovatief, informatief en het is de uitdrukkelijke bedoeling om dit te publiceren. Gezien de mogelijkheden tot een bredere toepassing van dit vaccin platform wordt het belang als groot ingeschat.
Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot de ontwikkeling van nieuwe vaccins die gemakkelijk gebruikt kunnen worden voor grootschalige bestrijding van hondsdolheid in mensen (en wellicht ook in honden), gele koorts en Japans encefalitis. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

De DEC concludeert dat de belangen van de samenleving die worden nagestreefd in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.
Het onderzoek is van groot belang voor miljoenen mensen in verschillende delen van de wereld. Het aantal doden veroorzaakt door infectie met een van de drie virussen waar de vaccins tegen ontwikkeld worden kan met behulp van een vaccinatieprogramma gebaseerd op de nieuwe vaccins aanmerkelijk gereduceerd worden. Bovendien kan het hier te testen vaccin platform in de toekomst mogelijk ook worden toegepast voor bescherming tegen andere pathogenen.
De expertise voor het verrichten van deze experimenten is beschikbaar binnen de instelling en bij de betrokken onderzoekers. De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek naar vaccins tegen verschillende virussen. De vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten is ruimschoots aanwezig. Door de zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens zullen de uitkomsten van dit onderzoek een betrouwbare voorspelling geven voor de werking van het vaccin in mensen. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. De 3Vprincipes worden

	gehonoreerd door hergebruik van dieren, en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen (training onder beloning). Het ongerief is maximaal matig. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven. De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling is het noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid van de kandidaat vaccins te onderzoeken in een diermodel dat grote overeenkomsten vertoont met de mens. De effecten van de kandidaat vaccins kunnen in dit diermodel goed worden onderzocht en ook kunnen eventuele nadelige effecten aan het licht komen. Gezien de grote voordelen van het beschikbaar komen van een goedkoop, breed toepasbaar en effectief combinatie vaccin platform tegen diverse ziekteverwekkers is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt. De DEC heeft extern advies ingewonnen bij - de aanvrager is om aanvullingen gevraagd De vragen betroffen: Enige tekstuele aanpassingen, nadere toelichting omtrent hoofddoelstelling, de te gebruiken vaccin technologie, fasering van de studies in bijlage 1, nadere onderbouwing van het benodigde aantal dieren. Tevens werd gevraagd om aanvullende informatie over biotechnische handelingen en humane eindpunten. Na aanpassing van de tekst werd bij een tweede bespreking verdere uitleg gevraagd over het aantal benodigde dieren per test groep in bijlage 1 en de go/no go momenten voor studies beschreven in bijlage 1 en 2. Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. Een van de DEC leden was betrokken bij de aanvraag. Deze persoon heeft zich teruggetrokken van de vergadering bij de bespreking van de aanvraag en overigens geen aandeel gehad in de afweging en advisering.
11.1	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	Citaat: The objectives of this project are to: 1) develop an immunization protocol for use with PLLAV-based vaccines, and to 2) evaluate the efficacy of novel PLLAV-based vaccines in rhesus macaques.
Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Citaat: This project is part of a larger research project with the ultimate goal to develop PLLAV-YFVax as universal vaccine platform technolooy for emeroinq infectious diseases, not limited to only viral infections. In the last two decades, the world experienced several outbreaks of virus infections caused by then unknown or less-known viruses, like Ebola, Zika, SARS, MERS, West Nile, Chikungunya, and avian influenza virus. These so-called 'emerging infectious diseases' or 'EIDs' are likely caused by (combinations of) socio-economic, environmental, and ecological factors, like climate change, international travel, changes in land use or agricultural practices etc. [...]. The abruptness of the outbreaks, that are associated with considerable morbidity and mortality, emphasizes the importance of the development of vaccines and antiviral compounds against EIDs [...]. As a result, there is a great demand for vaccine technologies that allow rapid development of safe and easy-to-produce vaccines against emerging infectious agents. The successful development of PLLAV-YFVax-RABV and PLLAV-IEVax-RABV will be a major step towards the development of PLLAV-YFVax as a universal vaccine platform for EID, but also for other infectious agents.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	Citaat uit DEC advies: Dit onderzoek zal worden uitgevoerd binnen een internationaal consortium in het kader van een door de EU gehonoreerd project. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven blijkt uit de jarenlange ervaring met het uitvoeren van vaccin onderzoek in makaken en de aandacht voor toepassing van vermindering en verfijning bij de dierproeven. 11.1

3V's

Vervanging	
	3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques: Citaat: With today's state of scientific knowledge, vaccines for human use can still only be developed using animal studies. Recent studies in rodent models have demonstrated the potency of the PLAVV-YFVax technology to induce protection against the yellow fever virus infection. However, because the immune system of rodents is evolutionarily distant from that of humans, these findings have only a limited predictive value forthe effectiveness of vaccine-induced immune responses in humans [1-4]. Thus, the predictive value of rodents for the efficacy of DNA vaccines for human use is limited. The main objective of this project is to develop the PLAW-YFVax technology, and to ready this technology for pre-clinical development. In vitro expression studies, and studies in rodents will play an important role in the early steps of the PLAVV-YFVax development. These studies will be used to assess the potential of novel constructs to produce LAVs, to test their immunogenicity, and to determine the safety in rodent models. But the nonhuman primate animal model, with its immunological and physiological similarities to humans, is most suitable preclinical model for evaluating the effectiveness and safety of this novel vaccine platform. In addition to the abovementioned similarities between NHP and humans, the use of different strategies to immunize animals in the skin requires an animal model with a skin architecture much like that of humans. NHP also fulfill this requirement [5,6],
	3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques: Citaat: With today's state of scientific knowledge, vaccines intended for use in humans can still only be developed using animal studies. Recent studies in rodent models have demonstrated the potency of the PLLAV-YFVax -technology to induce protection against the yellow fever virus infection, However, because the immune system of rodents is evolutionarily distant from that of humans, these findings have only a limited predictive value forthe effectiveness of vaccine-induced immune responses in humans [1-4]. The main objective of this project is to develop the PLLAV-YFVax technology for the production of vaccines, and to ready this technology for pre-clinical development. Rodent models will play an important role in the early steps of the PLLAV-YFVax development, but the nonhuman primate animal model, with its immunological and physiological similarities to humans, is the most suitable preclinical model for evaluating the effectiveness and safety of this novel vaccine platform

Verminderen	
	3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques: Citaat: This animal procedure involves the development of a protocol for intradermal injection of PLAVV in the skin of macaques. A small-scale study in macaques already provided proof-of-concept for the PLLAV technology in macaques. Because of the explorative nature of the study no statistical support for the number of animals can be provided. Everything will be done to keep the number of animals that will be used in this phase of the project as low as possible. Each study will be performed in a step-wise design, starting with two animals per parameter. Only when no sufficient results are obtained, extra animals will be used in a second study after approval of the institutional Animal Welfare Body.
	3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques: Citaat: Statistical calculations for the number of animals per vaccine group will be based on the results of published studies in macaques using commercial vaccines for YFV, JEV, and RABV. This power analysis will give the minimum number of animals required for a statistically valid experimental design. Furthermore, we aim to evaluate different vaccine candidates in a single experiment, so that a single control group can be used and the number of animals needed can be reduced significantly.

Verfijnen	
	3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques: Citaat: Immunization will be performed without a needle using needle-free injection methods. Needle-free injection methods are virtually painless and will reduce the risk of trauma because the immunization causes less damage to the tissue. Biopsies will be taken under anesthesia. After skin biopsies are taken, the wounds will be stitched, and analgesia will be administered. The animals are trained to work voluntarily as possible to invasive biotechnical actions such as giving of an anesthetic, or immunization. All observations will be documented and registered in a digital database at the institute. For the experiments, the standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of vaccine-related side-effects.
	3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques: Citaat: In case of YFV, JEV, and RABV vaccines, the immune correlates of protection in macaques are known. This makes an experimental infection with these viruses after immunization superfluous, and thus, viral challenge is not a part of the studies. This significantly reduces the discomfort caused to the animals by the experimental procedures. Immunization will preferentially be performed without a needle using needle-free methods. These methods are virtually painless and may reduce trauma because the immunization causes less damage to the tissue. The immunizations and blood collections will be performed under sedation, and at the same time body temperature and body weight will be measured, The animals are trained to comply voluntarily as much as possible with invasive biotechnical procedures such as giving of an anesthetic or immunization. During the study, the animals will be monitored daily by experienced animal caretakers, and at each sedation time-point the animals will be examined. Changes in behavior, appetite, appearance etc. will be documented. These, including changes in blood parameters, will be used to prepare a clinical score list for use in future PLLAV-related studies. If an animal shows behavioral changes, weight loss, or illness it will be decided in consultation with the veterinarian whether treatment is needed. In case of severe illness, an animal it will be taken directly off the protocol and will be euthanized to prevent further distress.
3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques: 11.1	
3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques:	
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.

3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques: Citaat: The animals that will be used in the experiments may have been used in previous, unrelated studies. Animals that have been used previously in other flavivirus studies are not suitable for re-use because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. Given the long life expectancy of this species, the animals may be re-used within the legal framework as described in art. 1e of the Law on Animal Experimentation (Wet op de Dierproeven). De dieren hebben in eerdere studies geen ernstig ongerief ervaren.
3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques: Citaat: The animals that will be used in the experiments may have been used in previous, unrelated studies. Animals that have been used previously in other flavivirus or rabies virus studies are not suitable for re- use because of the strong immunological cross-reactivity between the different viruses. Given the long life expectancy of this species, the animals may be re-used within the legal framework as described in art. 1e of the Law on Animal Experimentation (Wet op de Dierproeven). De dieren hebben in eerdere onderzoeken geen ernstig ongerief ondervonden.

Naam proef	**Worden de dieren gedood?**	**Doden volgens richtlijn?**
3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques	HEP: <1%	Citaat: During the study, the animals are monitored twice daily for changes in general behaviour. When sedated, the animals are examined for local adverse effects. If an animal is seriously ill, the veterinarian will be informed. If the animals cannot be treated, this will be seen as a humane endpoint and the animal will be euthanized.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: Matig	
3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques	HEP: <1%	Citaat: Because serious side effects due to YFV, IEV or RABV live-attenuated vaccines have not been described in macaques, it is not possible to provide clear criteria to define a humane endpoint. However, through intensive monitoring of the animals after immunization deviations in behaviour, appetite, etc. will be noticed quickly. In addition, the animals are weighed at each blood sampling. A large weight loss of >20% relative to the weight at the start of the study can be considered a humane endpoint. If changes in behavior are noticed, or a large weight loss is monitored, the veterinarian will be consulted. The veterinarian will decide if the animal has reached a humane endpoint and needs to be euthanized,
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: Licht	

5 Samenvatting

11.1

11.1

11.1 [redacted]

[redacted]

[redacted]

11.1 [redacted]

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

11

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020171326

Bijlagen
1

Datum 22 februari 2018
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e ,

Op 6 november 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines" met aanvraagnummer AVD5020020171326. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

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

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 22 februari 2018 tot en met 31 december 2022.
De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie (DEC) 10.2.g gevoegd. Dit advies is ontvangen op 6 november 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Nadere vragen aanvrager
Op 29 januari 2018 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op een verheldering van het maximaal aantal huidbiopten dat per dier genomen zal worden. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen
Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf
Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d van de wet. Beoordeling achteraf is nodig vanwege gebruik van niet-humane primaten. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

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

Datum:
22 februari 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020171326

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2.g

ir. J.F.M. Daemen
Wnd. Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 22 februari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines" met aanvraagnummer AVD5020020171326, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Section Head Molecular Virology.
Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 6 november 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
   a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 6 november 2017;
   b Bijlagen dierproeven
      - 3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques, zoals ontvangen op 6 november 2017;
      - 3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques, zoals ontvangen op 6 november 2017;
   c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 6 november 2017;
   d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 6 november 2017
   e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 januari 2018.

Naam proef	**Diersoort/ Stam**	**Aantal dieren**	**Ernst**
3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	18	Matig
3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	120	Licht

Voorwaarden

Beoordeling achteraf
In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken

Aanvraagnummer:
AVD5020020171326

of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Ter informatie
Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

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

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD5020020171326

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:
AVD5020020171326

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 blijven 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.

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

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

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

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