	Inventaris Wob-verzoek W19-02								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS20186345	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier (p.2-4)				x		x	x	
2	NTS origineel (p.6-8)			x					
3	projectvoorstel origineel (p.10-17)				x			x	
4	Bijlage dierproeven 1origineel (p.18-28)				x			x	
5	Ontvangstbevestiging en factuur (p. 29-33)				x		x	x	
6	brief aanhouden beoordelen (p. 34-38)				x		x	x	
7	aanvullende informatie (p.39-40)				x		x	x	
8	projectvoorstel herzien (p. 41-51)				x			x	
9	bijlage dierproeven 1 definitief (p. 52-56)			x					
10	bijlage dierproeven 2 definitief (p.57-66)				x			x	
11	bijlage dierproeven 3 definitief - herziene versie van bijlage 1 origineel (p. 67-77)				x			x	
12	DEC advies (p. 78-88)				x			x	
13	factuur (p. 89)				x		x	x	
14	aanvullende mail nts (p. 90)				x		x	x	
15	NTS herzien	x							
16	Advies CCD (p. 91-112)				x		x	x	x
17	Beschikking en vergunning (p. 113-120)				x		x	x	

31 AUG 2018

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	10.2.g
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e ☐ Dhr. ☒ Mw.
		Functie	10.2.e
		Afdeling	10.2.e
		Telefoonnummer	10.2.e
		E-mailadres	10.2.e
1.5	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

1.6	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e ☒ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	10.2.e
		Afdeling	10.2.e
		Telefoonnummer	10.2.e
		E-mailadres	10.2.e
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 - 09 - 2018
		Einddatum	01 - 09 - 2023
3.2	Wat is de titel van het project?	Evaluatie van	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en parkinson dementie	
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	10.2.g
		E-mailadres	10.2.g

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1285 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

☐

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 [redacted]
Functie	10.2.e [redacted]
Plaats	10.2.e [redacted]
Datum	30 - 08 - 2018
Handtekening	10.2.e en 10.2.g [redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

2

Dit is een 1 op 1 kopie van het CCD formulier, waarbij de invulvelden niet beveiligd zijn. Voor indiening bij de CCD moet de door de DEC goedgekeurde versie in het CCD formulier worden overgezet.
Versie CCD formulier dd. 2016-03-02

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	Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie
1.2 Looptijd van het project	1 september 2018 tot 1 september 2023
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Ziekte van Parkinson, gedrag, therapieën, diermodel, hersenen

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)	Het project betreft het testen van nieuwe behandelingen voor de ziekte van Parkinson, een veelvoorkomende ouderdomziekte van het brein waarbij de controle over bewegingen verstoord is. Door de vergrijzende samenleving neemt het aantal Parkinsonpatiënten snel toe. Bij de ziekte van Parkinson zijn bepaalde hersencellen die het stofje dopamine maken, dat een rol speelt in de coördinatie van bewegingen, afgestorven. Daarnaast raken ook andere hersengebieden voor geheugenfuncties ontregeld, waardoor Parkinson dementie ontstaat. Er is een aantal geneesmiddelen beschikbaar die het tekort aan dopamine aanvult en daarmee de motorfunctie herstelt. Deze geneesmiddelen vertonen echter veel bijwerkingen en verlichten alleen de bewegingssymptomen en niet de geheugenstoornis. Er is derhalve een grote behoefte aan nieuwe behandelingen. Als gevolg van de complexiteit van de ziekte van Parkinson is het gebruik van diermodellen voor het onderzoek naar de effectiviteit van nieuwe behandelingen onvermijdelijk.

3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Er zijn nog steeds geen effectieve behandelingen zonder ernstige bijwerkingen tegen de ziekte van Parkinson. Dit project zal belangrijke informatie opleveren over de effectiviteit van behandelingen die worden ontwikkeld voor de ziekte van Parkinson. Daarmee draagt dit project direct bij aan de selectie van veelbelovende therapeutische strategieën voor verdere klinische studies in de mens.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	48 resusapen.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De dieren zullen stress, en mogelijk pijn ondervinden ten gevolge van biotechnische handelingen. Ook kunnen de dieren stress ondervinden ten gevolge van de ziekte.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Matig
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Dieren zullen worden gedood als onderdeel van de dierproef.

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.	Alleen behandelingen die op basis van van literatuur, *in vitro* technieken en/of computermodellen veelbelovend zijn worden verder onderzocht in de dieren. De ziekte van Parkinson is een complexe ziekte waarbij er verstoringen zijn in de interacties tussen verschillende hersengebieden. Met de huidige stand van de proefdiervrije alternatieven is het op dit moment niet mogelijk deze complexe interactie en het effect van een behandeling *in vitro* te onderzoeken.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Voordat een nieuwe behandeling in apen wordt getest wordt het eerst aan de hand van literatuur en computermodellen geoptimaliseerd. Indien het om een geneesmiddel gaat, is het middel al uitgebreid getest *in vitro* en/of in andere diersoorten, bijvoorbeeld muizen. Het aantal benodigde dieren wordt per experiment bepaald aan de hand van statistische analyses.
4.3	**Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	De ziekte van Parkinson wordt geïnduceerd met het stofje MPTP. Dit model in de aap lijkt in de meeste aspecten op de ziekte in de patient en heeft een goede voorspellende waarde. In veel studies wordt de kleine penseelaap ingezet. Echter, voor onderzoek met deep brain stimulatie is de resusaap geschikter vanwege het grotere brein. De in groepsgehuisveste dieren worden getraind om niet-belastende taken uit te voeren om herstel te meten. Daarnaast worden telemetrische methoden gebruikt waarbij de dieren hun natuurlijke gedrag zo veel mogelijk kunnen vertonen.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Voor aanvang van de studie kunnen de dieren wennen aan de gedragstesten en worden ze getraind om gedragstaken uit te voeren. Ook worden ze getraind mee te werken aan biotechnische handelingen. De handelingen worden alleen waar nodig onder verdoving uitgevoerd en pijnmedicatie wordt gegeven om de eventuele pijn te verlichten

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	
Andere opmerkingen	

Centrale Commissie Dierproeven

3

Dit is een 1 op 1 kopie van het CCD formulier, waarbij de invulvelden niet beveiligd zijn. Voor indiening bij de CCD moet de door de DEC goedgekeurde versie in het CCD formulier worden overgezet.
Versie CCD formulier dd. 2016-03-02

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.	Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie

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 depressie, slaapverstoring, constipatie en geheugenproblemen, genaamd Parkinson dementia [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 vooral 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 tevens slaap en cognitieve functies verstoord zijn, zoals planning door een verstoorde cholinerge balans. Dit treedt al vroeg in het ziekteproces op [7-9].

Behandeling: Op dit moment zijn er alleen medicijnen beschikbaar die de symptomen onderdrukken. Deze middelen zijn gericht op een verbetering van de dopamine transmissie. 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. Daarnaast worden ook dopamine agonisten toegepast. Al deze medicijnen leiden op termijn tot vervelende bijwerkingen [10]. Bovendien bestrijden deze medicijnen alleen de motorische symptomen van de ziekte. Daarom is het van belang om nieuwe behandelmethodes te ontwikkelen die de kwaliteit van leven van de patiënt verbeteren.
Naast farmacologische behandelingen worden er bij voorkomende gevallen ook niet-farmacologische methodes gebruikt zoals 'deep brain stimulatie' (DBS) waarbij een 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 wel 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 tot vroegtijdige sterfte leidt.
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 deze mensen een ziektebeeld dat niet te onderscheiden was van de ziekte van Parkinson [11]. Sinds die tijd is het MPTP-model het aangewezen model voor deze ziekte. Het voordeel van MPTP tegenover andere inductiemodellen 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. MPTP-geïnduceerde schade aan de dopamine-producerende cellen in de substantia nigra in deze diermodellen is vergelijkbaar met die in de Parkinson-patient [12]. De rat is echter ongevoelig voor MPTP [13] (Tabel 1). De klinische symptomen van de ziekte van Parkinson zoals verstoorde motorfunctie, tremoren, apathie en verminderde gelaatsuitdrukking, komen in het aapmodel overeen met die in Parkinsonpatiënten [14]. In tegenstelling tot de aap en de mens, verdwijnen bij de kat optredende symptomen spontaan binnen twee weken en bij knaagdieren gebeurt dit zelfs al binnen twee dagen [13]. 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. Een ander belangrijk aspect in het aapmodel 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, 14-15]. Voor de MPTP-studies gaan wij uit van de aanwezige kennis die is opgedaan in eerdere succesvol verlopen MPTP-studies in de marmoset [16-24]. Het MPTP-model in de resusaap is een veel toegepast en goed gevalideerd model [25-26].

Voor het modelleren van Parkinsondementie wordt schade aangebracht door middel van intracraniale injectie van de toxische stof ME20.4-saporine in de basale kern van Meynert (NBM) [27]. De NBM innerveert de hersenschors (cortex) via cholinerge projecties en is betrokken bij Parkinsondementie [27]. Progressieve schade aan de neuronen in de NBM bij de ziekte van Parkinson, resulteert in de voortdurende verslechtering van cognitieve symptomen [28]. De intracraniale stereotactische injectie van saporine in de NBM wordt gedaan met behulp van, op neuroimaging gebaseerde, navigatie (zoals bv CT-scan) of met behulp van corticale afleiding van hersensignalen (EEG) die worden opgewekt door een stimulatieelektrode die gelijktijdig met de injectienaald in de NBM wordt ingebracht. Aangezien de NBM naar de hersenschors (cortex) projecteert, is de reactie van een lokale stimulatie in de NBM in het EEG van de cortex terug te zien. Op deze wijze kan men controleren of de naald op de juiste positie zit.
Aangezien de resusaap een grotere aapsoort is dan de marmosetaap, is de resusaap geschikter voor het aanbrengen van lokale schade in de NBM en het plaatsen van DBS-elektroden in specifieke hersenkernen. Dit vanwege de grotere hersenen waarbij de spatiele resolutie, voor het plaatsen van DBS-elektroden als therapie tegen Parkinsonsymptomen, groter is ten opzichte van de marmosetaap. Een soortgelijke studie met DBS in de NBM is eerder toegepast in de resusaap [29]. In deze studie werd DBS van de NBM echter toegepast in gezonde resusapen, terwijl de therapie is gericht op patiënten met Parkinsondementie. Stimulatie van optimaal functionerende hersenen levert een ander resultaat op dan van verstoorde hersenen. In het aangevraagde onderzoek zal het effect van DBS-stimulatie in resusapen met cholinerge deficiëntie, zoals bij Parkinsondementie, onderzocht worden.
Onderzoek naar een nieuwe behandeling voor Parkinsondementie in het resusaapmodel zal de translationele waarde van een therapie verhogen voordat deze wordt toegepast bij Parkinsonpatiënten lijdend aan dementie.

Daarnaast is het aapmodel geschikt voor het testen van klinisch relevante gedragsveranderingen behorende bij de ziekte van Parkinson en Parkinson dementia, zoals activiteit, effecten op het circadiane ritme en op slaap en cognitieve verstoringen met betrekking tot planning en attentie. Veel kennis over deze parameters zijn uit eerdere studies verkregen [9, 16-18, 22-23, 30-32].

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

	Soort				
Effect	Rat	Muis	Kat	Aap	Mens
Niet-motorische symptomen (zoals cognitie en slaapstoornis)	-	-	?	+	+
Klinische symptomen	-	2 dagen	2 weken	Persistent	Persistent
Schade aan substantie nigra (dopamine-producerende cellen)	-	+	+	+	+

Voorbeelden van type studies waarin het resusaap Parkinsonmodel 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 naar behandelingen die het ziekteproces beïnvloeden waarbij het ziekteverloop gevolgd moet worden op basis van klinische symptomen. Bij knaagdieren treedt een spontaan herstel van de symptomen op waardoor het volgen van het verloop van de ziekte niet mogelijk is.

-Studies naar premotorische symptomen, zoals cognitieve verstoringen welke door de patient als zeer invaliderend worden ervaren. In de aap zijn ook premotorische symptomen aangetoond, zoals slaap- en cognitieverstoring. Middels een PET-CT-scan kunnen vroege veranderingen van zowel dopamine als choline in de mens en in de aap worden aangetoond, waardoor een toekomstige behandeling in de aap kan worden gevalideerd om daarna in de mens te worden ingezet. Het meten van een PET-scan in de aanwezigheid van elektroden geeft geen verstoring van de meting en is eerder in de resusaap uitgevoerd [33].

- Studies naar behandelingen met DBS. DBS is een veelbelovende behandelmethode, niet alleen voor motorische verstoringen in dopaminerge kernen maar ook voor de cognitieve problemen waarbij cholinerge kernen worden gestimuleerd. Door de grotere hersenomvang is het spatiele resolutie in de resusaap beter dan in kleinere primaten. De huidige DBS in het striatum bij patiënten, voor het verminderen van tremoren, is ontwikkeld dankzij het onderzoek in de resusaap. DBS zou ook van toepassing kunnen zijn om de cognitieve verstoringen bij de ziekte van Parkinson te verbeteren. Studies met gezonde apen toonde een verdere toename van geheugenfuncties na stimulatie van de NBM [19].

- Het MPTP-model in de marmoset heeft de voorkeur voor de inductie van de ziekte van Parkinson vanwege de jarenlange ervaring en de uitgebreide batterij aan gedragstesten. Het MPTP-model in de resusaap wordt toegepast bij DBS vanwege het grotere brein, zoals hierboven aangegeven. Ook zal afhankelijk van de teststof de resusaap ingezet worden. Indien onderzoek aan een bepaalde teststof in eerdere studies in de resusaap is uitgevoerd, kunnen de resultaten beter vergeleken worden als hetzelfde diermodel wordt gebruikt.

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?

3.2.1

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 verschillende aspecten van de ziekte van Parkinson onderzocht in het resusaap Parkinsonmodel. De resultaten van deze studies worden gebruikt voor selectie van kandidaat geneesmiddelen of voor de optimalisatie van behandelmethodes voor verdere klinische studies. Een potentieel nieuwe behandeling wordt alleen onderzocht in het aapmodel als in andere diermodellen geen ernstige bijwerkingen naar voren gekomen zijn en er aanwijzingen zijn dat de behandeling effectief kan zijn tegen de ziekte van Parkinson. Het concrete doel van dit project is selectie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson en bijkomende aspecten zoals dementie voor verdere klinische studies. Het is de verwachting dat binnen de looptijd van dit project 3 nieuwe methoden onderzocht gaan worden. Het uiteindelijke doel van het onderzoek is dat behandelmethodes beschikbaar komen waarmee de symptomen van de ziekte van Parkinson voor de patiënt worden verlicht en de verdere achteruitgang wordt verminderd of voorkomen.

3.2.2 feasibility

Binnen het instituut bestaat uitgebreide ervaring met het werken met niet-humane primaten en grote expertise op het gebied van de ziekte van Parkinson. De hoofdonderzoeker heeft meer dan 20 jaar ervaring met onderzoek naar de ziekte van Parkinson en cognitieve verstoringen [9, 16-17, 19-24, 32, 34-36]. De infrastructuur en de expertise zijn aanwezig om deze studies veilig en binnen de gestelde termijn uit te voeren. Dit onderzoek wordt uitgevoerd in samenwerking met ervaren neurochirurgen. Eerst wordt een feasibility studie uitgevoerd met drie dieren waarbij de procedure van het aanbrengen van schade in de NBM en het meten van het effect in de PET-CT scan wordt getest.

3.2.3 Zijn voor het uitvoeren van dit project andere wet en regelgeving van toepassing dat het welzijn van de dieren of de uitvoering van het project zou kunnen beinvloeden?
Nee, niet van toepassing

Referenties bij 3.1 en 3.2

1. Mehanna, R., Moore, S., Hou, J.G., Sarwar, A.I., Lai, E.C. (2014) Comparing clinical features of young onset, middle onset and late onset Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 20:530-534
2. Gasser, T. (2005) Genetics of Parkinson's disease. Curr Opin Neurol 18:363–369
3. Tolosa, E., Gaig, C., Santamaria, J. & Compta, Y. (2009). Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. Neurology, 72, S12-20
4. Jellinger, K.A. (2008). Neuropathological aspects of Alzheimer disease, Parkinson disease and frontotemporal dementia. Neurodegener Dis, 5, 118-121

10 .2. [redacted] :
g [redacted]

6. Alexander, G.E. & Crutcher, M.D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. Trends Neurosci, 13, 266-271
7. Iranzo, A., Molinuevo, J.L., Santamaria, J., Serradell, M., Marti, M.J., Valldeoriola, F. & Tolosa, E. (2006). Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. Lancet Neurol, 5, 572-577

10 .2. [redacted]
g

10. Jenner, P. (2003). The contribution of the MPTP-treated primate model to the development of new treatment strategies for Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord, 9, 131-137
11. Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W. & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science, 219, 979-980
12. Javitch, J.A., D'Amato, R.J., Strittmatter, S.M., Snyder, S.H. (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A, 82, 2173-2177
13. Schmidt, N. & Ferger, B. (2001). Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. J Neural Transm, 108, 1263-1282

14. Eslamboli, A. (2005). Marmoset monkey models of Parkinson's disease: which model, when and why? Brain Res Bull, 68, 140-149
15. Hardman, C.D., Henderson, J.M., Finkelstein, D.I., Horne, M.K., Paxinos, G. & Halliday, G.M. (2002). Comparison of the basal ganglia in rats, marmosets, macaques, baboons, and humans: volume and neuronal number for the output, internal relay, and striatal modulating nuclei. J Comp Neurol, 445, 238-255
10.2.g
25. Bezard E, Przedborski S. A tale on animal models of Parkinson's disease. Mov Disord. 2011; 26:993–1002.
26. Fox SH, Brotchie JM. The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. Prog Brain Res. 2010; 184:133–157.
27. Fine A., Hoyle C., Maclean C.J., LeVatte T.L., Baker H.F., Ridley R.M. Learning impairments following injection of a selective cholinergic immunotoxin, ME20.4 IgG-saporin, into the basal nucleus of Meynert in monkeys, Neuroscience. 81 (1997) 331–343.
28. Bohnen NI, Albin RL. White matter lesions in Parkinson disease. Nat Rev Neurol. 2011 7(4):229-36.
29. Lui R, J. Crawford, P.M. Callahan, A.V.J. Terry, C. Constantinidis, D.T. Blake, Intermittent Stimulation of the Nucleus Basalis of Meynert Improves Working Memory in Adult Monkeys., Curr. Biol. (2017).
10.2
.g
31. Spinelli, S., Pennanen, L., Dettling, A.C., Feldon, J., Higgins, G.A., Pryce, C.R. (2004). Performance of the marmoset monkey on computerized tasks of attention and working memory. Brain Res Cogn Brain Res. 19(2):123-37
10.
2.g
33. Vandehey NT, Garell PC, Hampel JA, Murali D, Smith EM, Davidson R, Converse AK, Nickles RJ, Christian BT (2009) PET measurement of changes in D2/D3 dopamine receptor binding in a nonhuman primate during chronic deep brain stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. J Neurosci Methods. 176(2):129-35.
10.
2.g

3.3 Belang

3.3.1. 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 ouderdomsziekte 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 alleen de motorische 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 en bijwerkingen voor het medicijn en moet de patiënt tussendoor regelmatig overstappen op andere medicijnen. 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 resusaap Parkinsonmodel 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 de behandeling worden ontdekt. Deze informatie is van belang voor het verdere traject van de behandelmethode voor klinisch gebruik.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests

De project stakeholders zijn organisaties zoals de Micheal J. Fox Foundation die zoeken naar methodes om de kwaliteit van leven voor de Parkinson-patient te verbeteren. Daarnaast hebben ook gezondheidsorganisatie interesse in het vinden van oplossingen voor het tegengaan van symptomen als gevolg van de ziekte van Parkinson. Verder zijn farmaceutische bedrijven geinteresseerd in diermodellen voor het valideren van hun kandidaat geneesmiddelen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het project zal bestaan uit meerdere studies waarin per studie één groep resusapen dient als controle en een of meerdere groepen resusapen 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. Nieuwe middelen worden alleen in het resus Parkinsonmodel onderzocht als er aanwijzingen zijn dat de behandeling werkzaam kan zijn en er geen aanwijzingen zijn dat de behandelmethode 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.

Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel (Bijlage 1):

Om de ziekte van Parkinson te induceren wordt MPTP systemisch toegediend bij resusapen in doseringen variërend tussen de 0,5-4 mg/kg. Het model wordt gebruikt om anti-Parkinson middelen te testen en behandelingen die compensatie in de hersenen stimuleren, zoals DBS. Dit zijn behandelingen die de symptomen onderdrukken. Tijdens en na de inductiefase zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd op klinische symptomen behorend tot de ziekte van Parkinson.

Om Parkinson dementia te induceren worden resusapen intracraniaal geïnjecteerd met ME20.4-saporine in de NBM. Hierdoor raakt het cholinerge systeem verstoord waardoor een verminderd cognitief vermogen

optreedt zoals bij de ziekte van Parkinson wat Parkinson-dementia wordt genoemd. Deze inductie van cognitieve achteruitgang kan alleen óf in combinatie met de MPTP inductie worden toegepast.
Tijdens en na de inductiefase zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd op klinische symptomen behorend tot de ziekte van Parkinson en worden geheugentaken uitgevoerd. Indien bloedmerkers gemeten moeten worden zal tijdens de dierproef een bloedmonster worden afgenomen. Voor en tijdens de studie zal middels een PET-CT-scan de hoeveelheid en de verdeling van dopamine of choline in de hersenen worden gemeten om veranderingen door ziekte inductie en door de behandeling daartegen te kunnen monitoren. 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 en bij Parkinson-dementia. 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 resusaap Parkinsonmodel, 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 of target molecuul, maar zal ook in de resusaap hetzelfde target moeten herkennen.
3. Het beoogde target moet vanuit wetenschappelijk oogpunt een bijdrage leveren over de kennis van de ziekte van Parkinson of Parkinson-dementia. 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 behandeling kan niet afdoende worden getest in een ander diersoort vanwege beperkte validiteit in deze diermodellen. Te denken valt aan DBS vanwege de grotere spatiele resolutie in resusapen of 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 behandeling kan meteen in de resusaap getest worden als er uit eerdere *in vivo* studies een indicatie is voor een behandelschema (Bijlage 1). In veel gevallen wordt een teststof door een externe partij aangeleverd om te testen in het Parkinsonmodel. 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 behandeling waarvan bekend is dat deze hierop aangrijpt. Hierdoor hopen we nieuwe aanknopingspunten voor de behandeling van de ziekte van Parkinson te kunnen ontdekken ten einde nieuwe behandelingmethode te kunnen ontwikkelen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Therapie evaluatie in het resusaap Parkisonmodel.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Dit is een 1 op 1 kopie van het CCD formulier, waarbij de invulvelden niet beveiligd zijn. Voor indiening bij de CCD moet de door de DEC goedgekeurde versie in het CCD formulier worden overgezet.
Versie CCD formulier dd. 2016-03-02

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: Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel.

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 resusaapmodel voor de ziekte van Parkinson (PD) en Parkinson Dementie (PDD).

In de beginfase van het project zullen we methoden ontwikkelen en valideren om PD en PDD bij resusapen te moduleren. Deze gevalideerde modellen in de resusaap zullen vervolgens in studies worden toegepast om effecten van therapieën voor PD en PDD te testen.
Deze modellen van PD en PDD zullen chemisch worden geïnduceerd met neurotoxinen. Deze toxinen zijn respectievelijk 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) en ME20.4-saporine.

1) MPTP is selectief voor dopamine producerende cellen en zal systemisch worden geïnjecteerd om schade aan te brengen aan de dopamineneuronen in de substantia nigra en dientengevolge symptomen van PD te induceren [1]. Voor de MPTP-studies gaan wij uit van de aanwezige kennis die is opgedaan in eerdere succesvol verlopen MPTP-studies in de marmoset [2-6].
2) ME20.4-saporine (hierna saporine genoemd) zal lokaal in de nucleus basalis van Meynert (NBM) worden geïnjecteerd om selectief schade aan te brengen in de daar aanwezige choline producerende cellen, waarbij de cholinerge deficiëntie-pathologie in PDD wordt nagebootst [7-8].

De dosis-effect relatie en de persistentie van symptomen die door het saporine worden veroorzaakt, zullen tijdens een validatieonderzoek worden onderzocht. Het effect zal worden gemeten aan de hand van veranderingen in het gedrag en in het neurotransmissiesysteem met behulp van *in vivo* positron emission tomography (PET)-CT-scans. Bovendien zullen dieren op het eindpunt van de studie worden geëuthanaseerd voor post-mortem pathologie van de hersenen.

De gebruikte *in vivo* PET-CT-scan methode en de post-mortem pathologie zal in daaropvolgende studies op vergelijkbare wijze worden uitgevoerd om de effecten van een therapie te evalueren. Daarbij zal in een of meerdere groepen dieren de experimentele behandeling worden toegediend en in een groep dieren een controle behandeling.

De primaire uitkomstparameter is de mate van het optreden van klinische symptomen zoals immobiliteit, apathie, tremoren en stijfheid bij PD en immobiliteit, apathie en alertheid bij PDD. 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. Deze klinische symptomen worden dagelijks gemonitord tijdens de ziekteinductie en later minstens driemaal per week.
Daarnaast worden er als secundaire uitkomstparameters ook andere gedragsparameters gemeten zoals de activiteit, het circadiane ritme of cognitie. Voor veel van de cognitietaken is de prefrontale cortex van belang die vooral bij mensen en apen goed ontwikkeld is. Deze gedragsfuncties kunnen op een standaard manier worden uitgevoerd zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Activiteit en het circadiane ritme wordt gemeten met een implanteerbare transmitter die onder narcose onder de huid wordt geplaatst.
Voor de ziekteinductie worden de dieren eerst gehabitueerd aan gedragsopstellingen en daar waar nodig, zoals bij een cognitietaak, getraind. Van alle gedragstaken worden basiswaarden gemeten van het, dan nog, naïeve dier. Tijdens en na ziekteinductie worden deze gedragstaken herhaald uitgevoerd om het verloop (progressie) van de ziekte te kunnen volgen en het effect van een behandeling te kunnen meten.
Tijdens de post-mortem pathologie wordt de ernst van de schade in de hersenen onderzocht. Deze wordt bepaald door histologische kwantificatie van functionerende dopamine producerende cellen in de substantia nigra en van acetylcholine producerende cellen in de NBM.

Andere parameters kunnen zijn:

1. Verlies van lichaamsgewicht
2. Afwijkende hematologie en bloedchemie
3. Verlies van motorfunctie gemeten, zoals activiteit, met gedragstest
4. Slaapstoornis en verstoorde circadiane ritme als gevolg van de ziekte van Parkinson middels elektro-encefalogram (EEG) en/of een actimeter.
5. PET- scan in het gesedeerde dier, onder algehele anesthesie, om de hoeveelheid aanwezige dopamine of choline in de hersenen te meten. Hiervoor wordt een radioactief label, zoals bijvoorbeeld [^{18}F]6-fluoro-DOPA (F-DOPA), ingespoten, wat in dopamine producerende cellen via de dopamine transporter wordt opgenomen en in de synaps van de nog functionerende cellen wordt uitgescheiden in het projectiegebied, zoals het striatum.

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.

De eerste fase van het project betreft de validatiestudie van de resus Parkinsonmodellen PD en PDD. Deze studie bestaat uit injectieprocedures van de neurotoxines, gedragstesten, bloedafname en PET-CT-scan. Aan het eindpunt van de studie worden dieren geëuthanaseerd en worden de hersenen geïsoleerd en gefixeerd voor pathologie.
In de daaropvolgende fase wordt het resus Parkinsonmodel toegepast voor preklinisch onderzoek naar PD/PDD-therapieën. Het onderzoeksplan in deze fase zal worden bepaald aan de hand van het type behandeling met betrekking tot de onderzoeksvraag en zal per studie aan de IvD worden voorgelegd. Echter, de uitkomstparameters, die zijn gebaseerd op gedragsevaluaties, functionele neuroimaging met PET-CT en pathologiestudies, blijven vergelijkbaar. Een studie wordt alleen ingezet als er voldoende aanwijzingen zijn dat de behandeling een gunstig effect zou kunnen hebben zonder dat er ernstige bijwerkingen optreden.

<u>Neurotoxine-injectie</u>
MPTP en saporine zijn de twee toxinen die zullen worden gebruikt om respectievelijk modellen van PD- en PDD-pathologie te moduleren. Afhankelijk van de vraagstelling van de studie kunnen de toxines afzonderlijk worden toegediend of gecombineerd. MPTP zal via een subacuut inductie protocol (herhaalde injecties binnen een tijdspanne van 2 weken) systemisch worden toegediend. MPTP passeert gemakkelijk de bloed-hersen

barrière en is zeer selectief voor dopamine producerende cellen. Het MPTP protocol zonder saporine wordt bij de resusaap gebruikt in geval van DBS behandeling voor het behandelen van motor symptomen óf wanneer eerdere experimenten, waarmee de resultaten vergeleken moeten worden, ook in de resusaap hebben plaatsgevonden.
Saporine moet lokaal worden toegediend in de nucleus basalis van Meynert (NBM). De lokale injectie van saporine in de NBM vereist een chirurgische techniek, zogenaamde stereotactische chirurgie, om het toxine precies in de NBM te lokaliseren en te injecteren. De chirurgische procedures zullen worden uitgevoerd onder algehele anesthesie. Een stereotact zal worden gebruikt om de positie van de naald te bepalen. De stereotactische coördinaten van de NBM worden verkregen uit de stereotactische resusaap-hersenenatlas [10] en, indien nodig, aanvullend met behulp van op neuroimaging gebaseerde navigatie (zoals bv CT-scan) of met behulp van corticale afleiding van hersensignalen (EEG) na een stimulatie in de NBM. Samen met de injectienaald wordt een stimulatie-elektrode ingebracht. Aangezien de NBM naar de hersenschors (cortex) projecteert is de reactie van een lokale stimulatie in de NBM in het EEG van de cortex terug te zien. Op deze wijze kan men controleren of de naald op de juiste positie zit. Met behulp van de stereotactische coördinaten van de NBM, wordt de naald door een boorgaatje in de schedel ingebracht (eventueel samen met een stimulatie elektrode voor positiebepaling). Dit gebeurt in beide hersendelen. Saporine zal lokaal via de naald worden geïnjecteerd in de NBM. De dieren krijgen na de operatie een herstelperiode van twee weken, waarna het effect van de ingreep wordt gecheckt met behulp van een PET-CT-scan met een ligand voor presynaptische cholinergeblaasjes. Met deze scan kan de afname van de corticale innervatie aangetoond worden. Twee weken na deze check, starten de gedragsmetingen en de DBS stimulatie, waarbij de dieren gevolgd zullen worden op klinische symptomen door observatie, gedragsveranderingen en met behulp van PET-CT-scans. Hieronder staat een voorbeeld hoe zo'n test schema eruit zou kunnen zien (Figuur 1). Controle dieren zullen een zogenaamde sham-operatie ondergaan onder vergelijkbare procedures, zonder dat de toxine wordt geïnjecteerd.

Weeks: 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Test week A	Test week A	surgery		PET-CT scan check		Test week A	Test week B	Test week A	Test week B	Test week A
							Deep brain stimulation			

Test week A

Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
observation	cognition	observation bodyweight PET-scan		observation

Test week B

Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
observation	cognition	observation		observation

Figuur 1: Voorbeeld van hoe een testschema voor een studie eruit kan zien. De eerste twee weken worden gebruikt voor het verzamelen van de basiswaarden van elk dier.

Gedragstesten

Gedragstesten worden uitgevoerd om het motorische en cognitieve functioneren voor en na ziekteinductie en tijdens of na toediening van een behandeling te evalueren. Het type van de toegepaste test kan variëren, afhankelijk van welk domein wordt geëvalueerd. Voor aanvang worden de dieren gehabitueerd aan de gedragsopstellingen en worden basiswaarden gemeten. De gedragsmetingen bestaan uit cognitietaken, activiteit in de thuiskooi, klinische observaties (zoals apathie, tremoren, eetlust, mobiliteit), slaap met behulp van activiteitsmetingen of van EEG-metingen.

EEG metingen

Aangezien bij neurologische aandoeningen de hersenactiviteit kan veranderen en zowel PD als PDD het circadiane ritme verstoren, is de hersenactiviteit (gemeten met EEG) een parameter om de ziekteinductie

en het effect van de therapie hierop te kunnen meten. Voor het meten van het EEG, o.a. voor slaapanalyses, wordt voor aanvang van de studie onder algehele anesthesie, door het veterinaire team een transmitter, voor telemetrische data acquisitie, met elektroden onder de huid of in de buikholte gebracht. De EEG-elektroden worden in de schedel geplaatst en de EMG-elektroden (elektro-myogram voor het meten van spierspanning) in spierweefsel van de nek en schouder (t.b.v. het identificeren van de droom(REM)-slaap). Indien in hetzelfde dier ook een stimulatie elektrode voor DBS moet worden geplaatst wordt deze ingreep tijdens dezelfde operatie uitgevoerd om het ongerief zo veel mogelijk te beperken. Pre- en post-operatief krijgen de dieren adequate pijnstilling om eventuele pijnervaringen als gevolg van de operatie tegen te gaan en antibiotica 1 dag voorafgaand aan de operatie en enkele dagen erna.

PET-CT

De PET-CT-procedures zullen worden uitgevoerd onder algehele anesthesie. Alvorens de aap de PET-portaal ingaat wordt een dosis radiotracer intraveneus geïnjecteerd, om de mate van innervatie van het dopaminerge of cholinerge systeem in de hersenen te meten. De aanwezigheid van EEG-elektroden vormt geen belemmering voor de PET scan. De scanacquisitie wordt binnen twee uur uitgevoerd, afhankelijk van welke radiotracer en type scanmethode wordt gebruikt. Deze apparatuur en expertise is aanwezig in de onderzoeksfaciliteit. Daarnaast wordt er samengewerkt met externe ervaren experts op dit gebied. Eerst wordt een feasibility studie uitgevoerd met drie dieren waarbij de procedure van het aanbrengen van schade in de NBM en het meten van het effect in de PET-CT scan met een ligand voor presynaptische cholinergeblaasjes wordt getest.

Weefsel collectie

Vóór de ziekte inductie wordt er onder sedatie bloed afgenomen voor het bepalen van individuele nulwaarden. Aan het eindpunt van de studie zullen dieren onder sedatie worden geëuthanaseerd. Bloed wordt afgenomen en de hersenen zullen worden verwijderd en gefixeerd voor pathologische studies. Afhankelijk van de pathologische analyses op de hersenen worden de dieren in voorkomende gevallen vóór de euthansie onder algehele narcose geperfuseerd.

Behandeling

Een behandeling bestaat uit elektrische stimulatie (DBS) van een bepaald hersengebied, zoals de NBM bij PDD of, zoals toegepast bij Parkinson-patiënten, de subthalamic nucleus (STN). Hiervoor wordt, op eenzelfde manier als bij het toedienen van intracraniaal toxine zoals hierboven beschreven onder 'Neurotoxine-injectie', een elektrode met behulp van een stereotact in het betreffende hersengebied geplaatst. Deze elektrode is bevestigd aan een stimulator die onderhuids wordt geplaatst, zoals bij Parkinson-patiënten wordt toegepast.
Naast elektrische stimulatie kunnen ook nieuwe geneesmiddelen (teststof) worden onderzocht op hun werkzaamheid. De toedieningsroute van teststof of controlepreparaat wordt per studie bepaald en is afhankelijk van de aard van de teststof. Afhankelijk van de toedieningsroute zal de teststof of controlepreparaat 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 (na positive reinforcement training) worden uitgevoerd om het dier het ongerief van sedatie te besparen.

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 6 resusapen per groep. Dit is afhankelijk van de te testen therapie en de statistische poweranalyse. Uit resultaten van eerdere Parkinson-studies met marmosetapen 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 uitleesparameter. De standaarddeviatie (SD) en de effect size (ES) van de klinische gedragsscore wordt geschat, op basis van de uitkomsten van de vooraf uit te voeren validatiestudie, 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 PD of PDD 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.
Om neuronale effecten (zoals bijvoorbeeld neurogenese, eiwit analyse of transcriptomics) in de hersenen te kunnen vergelijken met de gezonde situatie wordt in studies, waarbij dit een onderdeel is, ook een naïeve groep (negatieve controlegroep waarbij geen PD of PDD wordt geïnduceerd) meegenomen (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 of aan de NBM 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 of apen die om andere redenen worden geëuthaniseerd.

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

Referenties:

1. D.C. German, M. Dubach, S. Askari, S.G. Speciale, D.M. Bowden, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonian syndrome in Macaca fascicularis: Which midbrain dopaminergic neurons are lost?, Neuroscience. 24 (1988) 161–174.
2. 10.2.g [redacted]
3. [redacted]
4. [redacted]
5. [redacted]
6. [redacted]
7. R. Liu, J. Crawford, P.M. Callahan, A.V.J. Terry, C. Constantinidis, D.T. Blake, Intermittent Stimulation of the Nucleus Basalis of Meynert Improves Working Memory in Adult Monkeys., Curr. Biol. (2017).
8. C. Blanco-Centurion, D. Gerashchenko, P.J. Shiromani, Effects of Saporin-Induced Lesions of Three Arousal Populations on Daily Levels of Sleep and Wake, J. Neurosci. 27 (2007) 14041–14048.
9. Guy W (1976) ECDEU assessment manual for psychopharmacology. Washington DC: US Department of Health, Education and Welfare; pp. 534–537
10. Paxinos, G., Huang, X. & Toga, A. W. (1999). The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, USA: Academic Press

B. De dieren

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

Volwassen resusapen (*Macaca mulata*) tussen 7 en 15 jaar, M/V, uit de eigen fokkolonie, n=48

De leeftijd tussen 7 en 15 jaar oud is gekozen omdat de dieren binnen deze leeftijden geslachtsrijp zijn, het centrale zenuwstelsel volledig is ontwikkeld en gedragsverlies als gevolg van het verouderingsproces kan worden verwaarloosd [11].

Er wordt geschat dat er de komende 3 jaar in totaal 3 nieuwe of herziene behandelmethoden plaats zullen vinden. Geschatte aantal studies is dus 3. Een studie zal worden uitgevoerd met een geschat aantal van 6 resusapen per groep en 2 tot 3 groepen per studie. Geschat wordt dat 1 studie uit 2 groepen zal bestaan ((1 studie x 2 groepen + 2 studies x 3 groepen) x 6 dieren = ((2+6) x 6) = 48 dieren).

Met voorkeur worden mannelijke apen gebruikt voor het onderzoek naar Parkinson dementie om mogelijke uitkomstvariatie te minimaliseren die wordt toegeschreven aan het geslacht. Bovendien kunnen hierdoor mogelijke invloeden van de oestrogeencyclus op de uitkomsten worden voorkomen [12]. Bij onderzoek naar de motor symptomen in het MPTP model, kunnen beiden geslachten gebruikt worden.

De primaire reden om preklinisch onderzoek voor de ziekte van Parkinson uit te voeren met apen is vanwege de meer ontwikkelde hersenstructuren in vergelijking tot knaagdieren. Bijvoorbeeld het striatum, het eindpunt van de dopaminerge neuronen afkomstig uit de substantia nigra, is in zowel mensen als apen goed gedifferentieerd in twee gebieden, het putamen en de nucleus caudatus. Bij knaagdieren is dit een enkelvoudige structuur. Dit geldt ook voor de cholinergische kernen in de basale voorhersenen die bij mensen en apen niet alleen bestaat uit de NBM, maar ook uit het mediale septum. Onderzoek bij apen heeft de voorkeur als het onderzoek een hoge specificiteit voor één van deze cholinerge kernen vereist. Voor veel van het Parkinson-onderzoek wordt de marmoset als aapmodel gebruikt. Dit is een kleine aapsoort met veel voordelen als model voor de ziekte van Parkinson. Echter in voorkomende gevallen is de marmosetaap te klein voor het onderzoek. Dit speelt wanneer er veel bloed moet worden afgenomen of wanneer er een hoge spatiele resolutie wordt vereist voor het plaatsen van bijvoorbeeld DBS-elektroden. Ook zal afhankelijk van de teststof de resusaap ingezet worden. Indien eerdere studies naar een bepaalde teststof in de resusaap zijn uitgevoerd, kunnen de resultaten beter vergeleken worden als hetzelfde diermodel wordt gebruikt.
In de geschiedenis van Parkinson-onderzoek heeft de resusaap een grote bijdrage geleverd aan de ontwikkeling van DBS. De validatie en het onderzoek naar de onderliggende mechanismen in de resusaap heeft ten grondslag gelegen aan de toepassing van DBS in de mens.

Referenties:
11. G.S. Roth, J.A. Mattison, M.A. Ottinger, M.E. Chachich, M.A. Lane, D.K. Ingram, Aging in rhesus monkeys: Relevance to human health interventions, Science (80-.). 305 (2004) 1423–1426.
12. A. Lacreuse, Effects of ovarian hormones on cognitive function in nonhuman primates, Neuroscience. 138 (2006) 859–867. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.09.006.

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 plaatsvinden 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 functieverlies. 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. Doordat de klinisch relevante Parkinson-symptomen niet spontaan verdwijnen in de aap-modellen voor de ziekte van Parkinson, is de aap 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. Als aap model wordt de marmosetaap, de cynomolgusaap en de resusaap gebruikt binnen dit onderzoeksveld. Het gebruik van het resusaapmodel bij Parkinson-onderzoek is veel toegepast en uitgebreid gevalideerd.

Het gebruik van apen bij PD/PDD-onderzoek dient vooral als een preklinische evaluatie van nieuwe therapieën voordat klinische trials in patiënten worden gestart. Aangezien de resusaap een grotere aapsoort is dan de marmosetaap, is de resusaap geschikter voor het plaatsen van DBS-elektroden en het aanbrengen van lokale laesies in specifieke kleine hersenkernen. Een soortgelijke studie met DBS in de NBM is eerder toegepast in de resusaap echter in gezonde apen zonder dat dementie-verschijnselen waren geïnduceerd [13]. Onderzoek naar een nieuwe behandeling voor PDD in het resusaapmodel zal de translationele waarde van een therapie verhogen voordat deze wordt toegepast bij Parkinson-patiënten lijdend aan dementie. Dit kan nog niet direct in de mens worden toegepast omdat het optimale frequentiepatroon van de stimulatie nog niet bekend is. Ook is nog niet bekend wat de neveneffecten van deze stimulatie op de hersenen is.

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. Een behandeling wordt daarna verder in de aap onderzocht om de vertaalslag naar de mens te vergroten.

Door een longitudinale studie toe te passen waarbij dieren gedurende een langere periode worden gevolgd met behulp van gedrags- en neuroimagingobservatie kan het aantal dieren worden beperkt. Het gebruik van *in vivo* PET-CT-scan zal informatie opleveren over veranderingen in dopamine en choline producerende cellen en hun receptoren over de tijd binnen dezelfde dieren. Dit bespaart veel dieren in vergelijking met een conventionele postmortem observatie waarbij voor hetzelfde resultaat meer dieren zijn vereist.

Het aantal benodigde dieren wordt per experiment bepaald aan de hand van power-analyse. Het minimaal aantal benodigde dieren zal worden gebruikt. Om het aantal dieren te verminderen wordt voor de selectie van de dieren van tevoren het gedrag van elk dier gemeten, zodat de groepen gelijke basiswaarden vertonen. De gedrags- en PET-CT-scan veranderingen na ziekteinductie en na behandeling worden daarna met de eigen oorspronkelijke performance (nulwaarden) vergeleken. Bovendien leidt het uitvoeren van meerdere verschillende testen in hetzelfde dier tot vermindering van het aantal proefdieren.

Verfijning

Voor de resusaap zijn diverse meetsystemen voorhanden om gedragsfuncties te kwantificeren. Deze functies kunnen op een standaard manier worden gemonitord zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Deze metingen kunnen plaatsvinden in de thuiskooi. Een voorbeeld is de 24-uurs activiteit en de lichaamstemperatuur middels een implanteerbare transmitter. Een ander voorbeeld is het meten van de hersenactiviteit (EEG), voor het meten van bijvoorbeeld slaap, waarbij eveneens een implanteerbare transmitter voor draadloze metingen wordt gebruikt waardoor de aap vrij kan bewegen. Voor zowel de temperatuur, activiteit als het EEG kan dezelfde transmitter worden gebruikt. De procedure voor het aanbrengen van EEG-elektrodes is in eerdere studies verfijnd, waardoor de uitval van dieren door technische

problemen sterk verminderd is [14]. Het gebruik van de PET-CT-scan maakt het mogelijk om veranderingen in de hersenen over de tijd binnen het afzonderlijke dier te kunnen volgen. Hiervoor moest voorheen een dier geëuthaniseerd worden om dit post-mortem histologisch te kunnen meten. Voor het meten van de cognitie worden de apen eerst 'gehabituueerd' aan de opstelling en daarna stapsgewijs voor de taak getraind. Doordat verschillende parameters in hetzelfde dier worden getest, is een nauwkeurigere meting van het effect van een behandeling mogelijk. Dit lijdt tot verfijning en draagt tevens bij tot een nauwkeuriger bepaling van humane eindpunten.

Referenties:
13 R. Liu, J. Crawford, P.M. Callahan, A.V.J. Terry, C. Constantinidis, D.T. Blake, Intermittent Stimulation of the Nucleus Basalis of Meynert Improves Working Memory in Adult Monkeys., Curr. Biol. (2017).
10.2.g [redacted]

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 zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan invasieve biotechnische handelingen zoals het toedienen van een injectie of het afnemen van bloed. Verder worden de dieren eerst gehabituueerd aan de gedragsopstellingen zodat ze op een vertrouwde wijze de gedragstaken kunnen uitvoeren en daar waar nodig getraind (bijvoorbeeld bij een cognitietaak).

Operaties: De operaties vinden plaats onder algehele anesthesie. Na een operatie wordt een postoperatieve herstelperiode van minstens twee weken toegepast. Na een intracraniale injectie wordt na twee weken met behulp van een PET-CT-scan de effectiviteit van de ingreep gecheckt. Analgesie zal pre- en postoperatief worden gegeven. Bovendien zal lokale anesthetica worden toegediend op de plaats van de chirurgische incisie. Als er tijdens observaties tekenen van pijn, ontsteking of infectie zijn, zullen er pijnstillers en/of antibiotica worden gegeven. PET-CT-scan meting vindt plaats onder algehele anesthesie.

Welzijn: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente dierverzorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag dan wordt de veterinair hiervan op de hoogte gesteld om te beoordelen of ingrijpen nodig is om ongerief tot een minimum te beperken.

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.

n.v.t.

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. Ook ervaren patiënten met een DBS geen pijn of ongerief van de aanwezigheid van een verblijfselektrode in de hersenen en de onderhuids-geplaatste stimulator. Wel ondervinden patiënten last van de verminderde controle over hun motorfuncties en cognitieve achteruitgang. 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 het inbrengen van een elektrode voor DBS vindt plaats onder algehele anesthesie met peri-operationele pijnstilling om eventuele pijnervaringen tegen te gaan.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. ongerief door toediening van een operatieve ingreep voor de intracraniale elektrode of -injectie
2. ongerief door sedatie en ontwaken uit sedatie
3. ongerief door klinische Parkinson-symptomen en dementie
4. ongerief door verlies van eetlust na MPTP
5. ongerief door verstoring van het circadiane ritme door schade in de NBM
6. ongerief door PET/CT procedure

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Vanwege de invasieve aard van de stereotactische ingreep voor de intracraniale injectie en het plaatsen van een intracraniale elektrode zal deze ingreep resulteren in een aantasting van het welzijn. Daarbij kan een post-operatieve infectie optreden als gevolg van een niet-intacte huid na chirurgische incisie.
2. Het ontwaken uit sedatie kan een gevoel van desorientatie geven.
3. Parkinsonisme leidt tot symptomen als apathie, mindere bewegelijkheid, tremoren en stijfheid. Het verlies van motorfuncties kan als stressvol worden ervaren. Daarnaast leidt PDD tot een verminderd cognitief vermogen waardoor het geheugen is aan getast. Dit kan tot verwarring leiden.
4. Het probleem met voedselinname wordt voornamelijk waargenomen bij dieren die zijn geïnjecteerd met het MPTP-toxine. MPTP vermindert de dopaminerge neurotransmissie, waardoor als gevolg ook de voedingsmotivatie vermindert.
5. Bekend is dat de basale cholinergische voorhersenen een rol spelen bij het circadiane ritme. Schade in de NBM door injectie met saporine kan daarom het circadiane ritme van het dier verstoren [8].
6. Aangezien de PET-CT scan procedure onder sedatie wordt uitgevoerd zal het ongerief beperkt blijven. Wel zal het dier hierdoor een gevoel van desorientatie na het ontwaken kunnen ervaren

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

1. De ingrepen worden verricht onder een multi-modale anesthesie. Profylactisch zal bij de intracraniale injectie peri-operatief antibiotica worden toegediend. Ongerief van incisie plaatsen zal naar verwachting licht zijn. Pijnmedicatie zal worden toegepast.
2. De bijverschijnselen na sedatie kunnen niet worden geantagoneerd. Wel worden de dieren 16-18 uur voor aanvang van de procedure nuchter gehouden om te voorkomen dat ze overgeven en aspireren na sedatie.
3. We werken met een cumulatieve discomfort schaal van de klinische symptomen. Dieren worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.
4. Indien nodig worden de dieren bijgevoerd met calorierijk voedsel om ernstig gewichtsverlies te voorkomen.
5. Deze verandering van het circadiane ritme wordt als een extra parameter gezien om de progressie van het ziektebeeld en herstel hiervan te kunnen volgen. Met behulp van een actimeter kan het circadiane ritme in de tijd gevolgd worden.
6. De dieren worden 16-18 uur voor aanvang van de PET-CT scan nuchter gehouden om te voorkomen dat ze overgeven tijdens de sedatie.

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 achtereenvolgende 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 (interesse in de omgeving), immobiliteit, alertheid, tremoractiviteit. Deze symptomen worden gescoord op een schaal van 0 (niet waargenomen), 1 (waargenomen maar onderdeel van normaal gedrag), 2 (waargenomen in een lichte vorm), 3 (duidelijk waargenomen), en 4 (waargenomen in een ernstige vorm).

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

De kans is klein dat deze criteria worden behaald vanwege het hanteren van de klinische scoringstabel en toepassen van humane eindpunten op basis van deze score en de huidige ervaring het bereiken van ernstig ongerief. Wij streven ernaar om geen uitval van dieren na de MPTP-toedieningen te krijgen door PD te induceren via herhaalde MPTP-injecties (maximaal 1 injectie per dag) waarbij tussen de injecties het klinische beeld wordt gevolgd waarbij de dosering van de MPTP afgesteld kan worden (0,5-4 mg/kg). Om uitval door saponine te voorkomen wordt tijdens de eerste validatiestudie 3 verschillende doseringen geïnjecteerd waarna de schade wordt gemeten in het brein met behulp van de PET-CT-scan met een tracer voor choline. De meest optimale dosis waarbij er wel schade is maar er ook nog cellen in de NBM intact zijn wordt toegepast in de volgende studies. De dosering-range wordt aan de hand van de literatuur bepaald. De kans op het behalen van dit criteria is daarom <5 %.

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.

Een essentieel onderdeel is uitgebreid onderzoek naar de pathologie in de hersenen. Om dit onderzoek te kunnen doen is het noodzakelijk de dieren te euthanaseren.

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

5

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre
10.2.e [redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020186345
Bijlagen
2

Datum 31 augustus 2018
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

10.2.e [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 augustus 2018. Het gaat om uw project "Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en parkinson dementie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020186345. 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:
31 augustus 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020186345

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:
31 augustus 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020186345

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.e
Afdeling:	10.2.e
Telefoonnummer:	10.2.e
E-mailadres:	10.2.e

Datum:
31 augustus 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020186345

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam:	10.2.e
Functie:	10.2.e
Afdeling:	10.2.e
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 september 2018
Geplande einddatum:	1 september 2023
Titel project:	Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en parkinson dementie
Titel niet-technische samenvatting:	Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en parkinson dementie
Naam DEC:	10.2.g
Postadres DEC:	10.2.g
E-mailadres DEC:	10.2.g

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.285,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:	[x] Projectvoorstel [x] Beschrijving Dierproeven [x] Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:	10.2.e
Functie:	10.2.e
Plaats:	10.2.g
Datum:	30 augustus 2018

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre
10.2.e [redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020186345
Bijlagen
2

Datum 31 augustus 2018
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 31 augustus 2018
Vervaldatum: 30 september 2018
Factuurnummer: 186345

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5020020186345	€ 1.285,00

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

6

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Biomedical Primate Research Centre
10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020186345

Datum 12 november 2018
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

10.2.e

Op 30 augustus 2018 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en parkinson dementie" met aanvraagnummer AVD5020020186345. 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 is op veel punten te moeilijk te volgen voor de leek. Zinnen/termen als: De motorische ziekte wordt geinduceerd met een toxische stof, een locale injectie met saporine, deep brain stimulatie, PK/PD studie, telemetrische methoden zullen bij het brede publiek niet bekend zijn. Graag de NTS op meerdere punten aanpassen zodat deze beter leesbaar wordt voor het brede publiek.

- In sectie 3.4 wordt u gevraagd in te vullen wat de biotechnische handelingen zijn, en wat de gevolgen voor de dieren hiervan zijn. Ook de gevolgen van de ziekte moeten beter worden beschreven.

Onduidelijkheden
- In bijlage dierproeven 3.4.4.1 beschrijft u PK/PD studies. Kunt u in deze bijlage onder Vervanging aangeven of u alvorens deze middelen in vivo te testen gebruik heeft gemaakt van in silico modeling? Zo nee, waarom niet?

- U beschrijft translationeel onderzoek. Daarbij beschrijft u het gebruik van alleen mannelijke dieren vanwege mogelijke effecten van oestrogenen op cognitie. In translationeel onderzoek kan het heel nuttig zijn om juist deze geslachtsverschillen mee te nemen in het onderzoek. Kunt u aanvullend onderbouwen waarom hier in dit geval niet voor gekozen is?

- In bijlage 3.4.4.2 en 3.4.4.3 worden de gedragstesten algemeen omschreven. Het is voor de CCD onduidelijk a) welke gedragstesten er gebruikt worden, b) welke dieren/groepen de individuele gedragstest betreft en c) wat de frequentie en duur is van de testen. Verder dient specifiek omschreven te worden hoeveel testen een individueel dier maximaal ondergaat en hoe vaak en hoe lang een rustperiode aan de dieren wordt geboden tussen de tests.

- De CCD vraagt zich ook af of in de cognitietesten gebruik gemaakt zal worden van voedsel- of waterdeprivatie. Indien dit het geval is dan dient u dit te beschrijven en te motiveren waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstelling.

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. 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,

Datum:
12 november 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020186345

Centrale Commissie Dierproeven
drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

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: AVD5020020186345

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:
12 november 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020186345

3 Ondertekening

Naam: .....

Datum: ..... - ..... - .....

Handtekening: .....

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag

CCD AVD5020020186345:.

Aan Centrale Commissie Dierproeven
10.2.e [redacted]
Datum November 13, 2018
Betreft Reactie op de brief 12-11-2018 aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD5020020186345 Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie in de resusaap.

Wij willen de CCD bedanken voor de aanvullende suggesties en commentaren. Hieronder staan onze reacties.

NTS:
-De NTS is op veel punten te moeilijk te volgen voor de leek. Zinnen/termenals: De motorische ziekte wordt geinduceerd met een toxische stof, een locale injectie met saporine, deep brain stimulatie, PK/PD studie, telemetrische methoden zullen bij het brede publiek niet bekend zijn. Graag de NTS op meerdere punten aanpassen zodat deze beter leesbaar wordt voor het brede publiek.
-In sectie 3.4 wordt u gevraagd in te vullen wat de biotechnische handelingen zijn, en wat de gevolgen voor de dieren hiervan zijn. Ook de gevolgen van de ziekte moeten beter worden beschreven.

Er is een aangepaste “niet technische samenvatting” geschreven welke is bijgevoegd.

In bijlage dierproeven 3.4.4.1 beschrijft u PK/PD studies. Kunt u in deze bijlage onder Vervanging aangeven of u alvorens deze middelen in vivo te testen gebruik heeft gemaakt van in silico modeling? Zo nee, waarom niet?

In Bijlage dierproeven 3.4.4.1 over de PK/PD studies is de *in silico* modeling toegevoegd. Deze was tijdens het schrijfproces onbedoeld verdwenen uit de tekst.

U beschrijft translationeel onderzoek. Daarbij beschrijft u het gebruik van alleen mannelijke dieren vanwege mogelijke effecten van oestrogenen op cognitie. In translationeel onderzoek kan het heel nuttig zijn om juist deze geslachtsverschillen mee te nemen in het onderzoek. Kunt u aanvullend onderbouwen waarom hier in dit geval niet voor gekozen is?

De keuze voor mannelijke dieren, binnen de studies naar geheugen functies bij de ziekte van Parkinson (alleen bij de Deep Brain Stimulatie studie) , is om het aantal dieren te beperken. Door ook vrouwelijke dieren hierbij te betrekken verwachten wij een grotere variatie in de data waardoor we meer dieren nodig zullen hebben om een significant verschil te kunnen aantonen. Het is niet dat we verwachten dat de vrouwelijke dieren anders zullen reageren, maar we verwachten wel veel meer variatie tussen de dieren en ook binnen een dier als gevolg van de hormonale schommelingen. In deze fase van het onderzoek is het nog niet nodig om deze potentieel additionele variabele bij deze vraagstelling in te brengen. Bij de Parkinson modellen met MPTP voor de motorische verstoringen kunnen we zowel vrouwen als mannen inzetten omdat bekend is dat dit in deze modellen geen verschil maakt.

In bijlage 3.4.4.2 en 3.4.4.3 worden de gedragstesten algemeen omschreven. Het is voor de CCD onduidelijk a) welke gedragstesten er gebruikt worden, b) welke dieren/groepen de individuele gedragstest betreft en c) wat de frequentie en duur is van de testen. Verder dient specifiek

omschreven te worden hoeveel testen een individueel dier maximaal ondergaat en hoe vaak en hoe lang een rustperiode aan de dieren wordt geboden tussen de tests.

De gedragstesten in bijlage 3.4.4.2 en 3.4.4.3 betreffen metingen van activiteit met een actiwatch, observaties van gedrag voor symptomen van de ziekte van Parkinson (tremoren, stijfheid, immobiliteit, gebrek aan aandacht etc), en cognitie met behulp van objecten of een 'touch screen' die de apen leren aan te raken. Op het 'touch screen' kunnen verschillende geheugen taken worden aangeboden. Dit gebeurt in de thuiskooi van de aap. De motivatie is een kleine beloning met verdunde siroop. Er vindt geen voedsel of waterdeprivatie plaats. De activiteit betreft een 24-uurs meting gedurende de duur van de studie. De dieren hebben hiertoe een actiwatch in een speciale halsband waarbij de dieren geen ongerief ondervinden en op geen enkele wijze gehinderd worden in hun normale activiteiten. Hierdoor kan tevens informatie over het circadiane ritme worden verkregen. Observaties van symptomen behorende bij de ziekte van Parkinson vinden minimaal 3 keer per week plaats en maximaal elke dag gedurende de tijdsduur van de gehele studie. Deze observaties in de thuiskooi nemen 10-15 minuten in beslag en zijn niet belastend. De cognitie taken worden maximaal 3 maal per week uitgevoerd zolang de studie duurt. Een sessie duurt maximaal 30 minuten. De dieren zijn getraind om deze taken uit te voeren. Het betreft een niet invasieve manier van meten omdat de dieren niet gefixeerd worden en de taak vanuit hun eigen thuiskooi verrichten. In een studie zal het gedrag bij alle apen van alle groepen gemeten worden.

De CCD vraagt zich ook af of in de cognitietesten gebruik gemaakt zal worden van voedsel- of waterdeprivatie. Indien dit het geval is dan dient u dit te beschrijven en te motiveren waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstelling.

Er wordt geen gebruik gemaakt water- of voedseldeprivatie of beperking. De dieren worden voorzien van hun reguliere voeding en *ad lib* water, zoals alle dieren bij het instituut.

13 november 2018, 10.2.e (verantwoordelijke onderzoeker)

Centrale Commissie Dierproeven

Dit is een 1 op 1 kopie van het CCD formulier, waarbij de invulvelden niet beveiligd zijn. Voor indiening bij de CCD moet de door de DEC goedgekeurde versie in het CCD formulier worden overgezet.
Versie CCD formulier dd. 2016-03-02

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.	Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie in de resusaap

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 depressie, slaapverstoring, constipatie en geheugenproblemen, genaamd Parkinson dementia [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 vooral 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 tevens slaap en cognitieve functies verstoord zijn, zoals planning door een verstoorde cholinerge balans. Dit treedt al vroeg in het ziekteproces op [7-9].

Behandeling: Op dit moment zijn er alleen medicijnen beschikbaar die de motor-symptomen onderdrukken. Deze middelen zijn gericht op een verbetering van de dopamine transmissie. 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. Daarnaast worden ook dopamine agonisten toegepast. Al deze medicijnen leiden op termijn tot vervelende bijwerkingen [10]. Bovendien bestrijden deze medicijnen alleen de motorische symptomen van de ziekte en niet de cognitieve achteruitgang. Daarom is het van belang om nieuwe behandelmethodes te ontwikkelen die de kwaliteit van leven van de patiënt verbeteren.
Naast farmacologische behandelingen worden er bij voorkomende gevallen ook niet-farmacologische methodes gebruikt zoals 'deep brain stimulatie' (DBS) waarbij een kern in de hersenen elektrisch wordt gestimuleerd met als gevolg een vermindering van de symptomen. DBS voor het behandelen van de motorische symptomen wordt inmiddels veelvuldig toegepast. Hierbij wordt de subthalamic nucleus of de globus pallidus elektrisch gestimuleerd. DBS zou ook een uitkomst kunnen bieden voor mensen die lijden aan Parkionson dementie. In dat geval zal de nucleus basalis van Meynert (NBM) gestimuleerd moeten worden. Dit wordt nog niet toegepast bij Parkinson patiënten. Ondanks het positieve effect in preklinische studies, is het precieze werkingsmechanisme in relatie tot verschillende stimulatie frequenties van deze methode nog onbekend. Meer inzicht hierin zal de ontwikkeling van dit nieuwe aangrijpingspunt voor de behandeling van dementie bij Parkinson patiënten 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:**

<u>De ziekte van Parkinson</u>:

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 wel 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 tot vroegtijdige sterfte leidt.

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 deze mensen een ziektebeeld dat niet te onderscheiden was van de ziekte van Parkinson [11]. Sinds die tijd is het MPTP-model het aangewezen model voor deze ziekte. Het voordeel van MPTP tegenover andere inductiemodellen 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. MPTP-geïnduceerde schade aan de dopamine-producerende cellen in de substantia nigra in deze diermodellen is vergelijkbaar met die in de Parkinson-patient [12]. De rat is echter ongevoelig voor MPTP [13] (Tabel 1). De klinische symptomen van de ziekte van Parkinson zoals verstoorde motorfunctie, tremoren, apathie en verminderde gelaatsuitdrukking, komen in het aapmodel overeen met die in Parkinsonpatiënten [14]. In tegenstelling tot de aap en de mens, verdwijnen bij de kat optredende symptomen spontaan binnen twee weken en bij knaagdieren gebeurt dit zelfs al binnen twee dagen [13]. 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. Een ander belangrijk aspect in het aapmodel 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, 14-15]. Voor de MPTP-studies gaan wij uit van de aanwezige kennis die is opgedaan in eerdere succesvol verlopen MPTP-studies in de marmoset [16-24]. Het MPTP-model in de resusaap is een veel toegepast en goed gevalideerd model [25-26].

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

	Soort				
Effect	Rat	Muis	Kat	Aap	Mens
Niet-motorische symptomen (zoals cognitie en slaapstoornis)	-	-	?	+	+
Klinische symptomen	-	2 dagen	2 weken	Persistent	Persistent
Schade aan substantie nigra (dopamine-producerende cellen)	-	+	+	+	+

Voorbeelden van type studies waarin het resusaap model voor de ziekte van Parkinson ingezet wordt:

- 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 naar behandelingen die het ziekteproces beïnvloeden waarbij het ziekteverloop gevolgd moet worden op basis van klinische symptomen. In dit geval zal er een geleidelijke MPTP toediening voor de inductie van een langzaam progressief Parkinson model worden toegepast. Bij knaagdieren treedt een spontaan herstel van de symptomen op waardoor het volgen van het verloop van de ziekte niet mogelijk is.

-Studies naar premotorische symptomen, zoals cognitieve verstoringen welke door de patient als zeer invaliderend worden ervaren. In de aap zijn ook premotorische symptomen aangetoond, zoals slaap- en cognitieverstoring.

- Het MPTP-model in de marmoset heeft de voorkeur voor de inductie van de ziekte van Parkinson en het testen van geneesmiddelen vanwege de jarenlange ervaring en de uitgebreide batterij aan gedragstesten [CCD 00810.2.g . De resusaap zal ingezet worden voor het testen van een geneesmiddel die aangrijpt op een specifiek target welke in eerdere studies in de resusaap is getest waardoor de resultaten van de verschillende geneesmiddelen beter vergeleken kunnen worden. Indien het gaat om een symptoom onderdrukkend geneesmiddel, zal een "snelle" inductie protocol met MPTP (subacuut) worden toegepast.

<u>Parkinson dementie</u>:

Voor het modelleren van Parkinsondementie wordt schade aangebracht door middel van intracraniale injectie van de toxische stof ME20.4-saporine in de basale kern van Meynert (NBM) [27].
ME20.4-saporine is een monoclonaal antilichaam-toxine complex waarvan het ME20.4 deel aan de P75 neurotrophin receptor bindt. Deze receptor is specifiek voor cholinerge neuronen in de NBM. Na binding van ME20.4 aan de receptor wordt het complex ME20.4-saporine opgenomen in de cholinerge neuron. In de neuron remt het toxische gedeelte 'saporine' de eiwit synthese in de ribosoom waardoor apoptose wordt geïnduceerd [28]. Door het selectief aanbrengen van schade in de NBM met saporine is het mogelijk om onderzoek te doen naar de cognitieve aspecten bij de ziekte van Parkinson.

De NBM innerveert de hersenschors (cortex) via cholinerge projecties en is betrokken bij Parkinsondementie [27]. Progressieve schade aan de neuronen in de NBM bij de ziekte van Parkinson, resulteert in de voortdurende verslechtering van cognitieve symptomen [29]. De intracraniale stereotactische injectie van saporine in de NBM wordt gedaan met behulp van, op neuroimaging gebaseerde, navigatie (zoals bv een *in vivo* positron emission tomography (PET)-scan) of met behulp van corticale afleiding van hersensignalen (EEG) die worden opgewekt door een stimulatieelektrode die gelijktijdig met de injectienaald in de NBM wordt ingebracht. Aangezien de NBM naar de hersenschors (cortex) projecteert, is de reactie van een lokale stimulatie in de NBM in het EEG van de cortex terug te zien. Op deze wijze kan men controleren of de naald op de juiste positie zit.
Aangezien de resusaap een grotere aapsoort is dan de marmosetaap, is de resusaap geschikter voor het aanbrengen van lokale schade in de NBM en het plaatsen van DBS-elektroden in specifieke hersenkernen. Dit vanwege de grotere hersenen waarbij de spatiele resolutie voor het plaatsen van DBS-elektroden, die gebruikt wordt voor het leveren van elektrische stimulatie als therapie tegen Parkinsonsymptomen, groter is ten opzichte van de marmosetaap. Een soortgelijke studie met DBS in de NBM is eerder toegepast in de resusaap [30]. In deze studie werd DBS van de NBM echter toegepast in gezonde resusapen, terwijl de therapie is gericht op patiënten met Parkinsondementie. Stimulatie van optimaal functionerende hersenen levert een ander resultaat op dan van verstoorde hersenen. In het aangevraagde onderzoek zal het effect van DBS-stimulatie in resusapen met cholinerge deficiëntie, zoals bij Parkinsondementie, onderzocht worden.
Onderzoek naar een nieuwe behandeling voor Parkinsondementie in het resusaapmodel zal de translationele waarde van een therapie verhogen voordat deze wordt toegepast bij Parkinsonpatiënten lijdend aan dementie.

Daarnaast is het aapmodel geschikt voor het testen van klinisch relevante gedragsveranderingen behorende bij zowel de ziekte van Parkinson als Parkinson dementia, zoals activiteit, effecten op het circadiane ritme en op slaap en cognitieve verstoringen met betrekking tot planning en attentie. Veel kennis over deze parameters zijn uit eerdere studies verkregen [9, 16-18, 22-23, 31-33].

Voorbeelden van type studies waarin het resusaap Parkinson dementie model ingezet wordt:
- 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.

-Studies naar premotorische symptomen, zoals cognitieve verstoringen welke door de patient als zeer invaliderend worden ervaren. In de aap zijn ook premotorische symptomen aangetoond, zoals slaap- en cognitieverstoring. Middels een PET-scan kunnen vroege veranderingen van zowel dopamine als acetylcholine in de mens en in de aap worden aangetoond, waardoor een toekomstige behandeling in de aap kan worden gevalideerd om daarna in de mens te worden ingezet. Het meten van een PET-scan in de aanwezigheid van elektroden geeft geen verstoring van de meting en is eerder in de resusaap uitgevoerd [34].

- Studies naar behandelingen met DBS. DBS is een veelbelovende behandelmethode voor de cognitieve problemen waarbij cholinerge kernen worden gestimuleerd. Door de grotere hersenomvang is het spatiele resolutie in de resusaap beter dan in kleinere primaten. De huidige DBS in het striatum bij patiënten, voor het verminderen van tremoren, is ontwikkeld dankzij het onderzoek in de resusaap. DBS zou ook van toepassing kunnen zijn om de cognitieve verstoringen bij de ziekte van Parkinson te verbeteren. Studies met gezonde apen toonde een verdere toename van geheugenfuncties na stimulatie van de NBM [19]. Er is veel ervaring met dit soort onderzoek in de resusaap [35].

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?

3.2.1

De ziekte van Parkinson is een ernstig invaliderende ziekte bij de mens waarvoor op dit moment slechts beperkte behandelingen beschikbaar zijn. Deze behandelingen bestrijden alleen de motorische symptomen en vertonen na verloop van tijd ernstige bijwerkingen. In dit project wordt daarom de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes tegen verschillende aspecten van de ziekte van Parkinson onderzocht in het resusaap Parkinsonmodel. Dit betreft de motorische symptomen, en Parkinson dementie waarbij in Parkinson patienten de cognitie is verstoord. De motorische ziekte van Parkinson wordt geïnduceerd met een toxische stof MPTP die deze aandoening nabootst. Parkinson dementie wordt geïnduceerd door een lokale injectie met saporine in een hersengebied die invloed heeft op cognitie.
Er is een grote behoefte aan nieuwe farmacologische en niet-farmacologische behandelingen zoals medicijnen tegen PD en deep brain stimulatie als behandeling bij PDD.
De resultaten van deze studies worden gebruikt voor selectie van kandidaat geneesmiddelen of voor de optimalisatie van behandelmethodes voor verdere klinische studies. Een potentieel nieuwe behandeling wordt alleen onderzocht in het aapmodel als in andere diermodellen geen ernstige bijwerkingen naar voren gekomen zijn en er aanwijzingen zijn dat de behandeling effectief kan zijn tegen de ziekte van Parkinson.
Het <u>concrete doel van dit project</u> is selectie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson en bijkomende aspecten zoals dementie voor verdere klinische studies. Het is de verwachting dat binnen de looptijd van dit project 3 nieuwe methoden onderzocht gaan worden. Het <u>uiteindelijke doel</u> van het onderzoek is dat behandelmethodes beschikbaar komen waarmee de symptomen van de ziekte van Parkinson voor de patiënt worden verlicht en de verdere achteruitgang wordt verminderd of voorkomen.

3.2.2 feasibility

Binnen het instituut bestaat uitgebreide ervaring met het werken met niet-humane primaten en grote expertise op het gebied van de ziekte van Parkinson. De hoofdonderzoeker heeft meer dan 20 jaar ervaring met onderzoek naar de ziekte van Parkinson en cognitieve verstoringen [9, 16-17, 19-24, 33, 36-38]. De infrastructuur en de expertise zijn aanwezig om deze studies veilig en binnen de gestelde termijn uit te voeren. Dit onderzoek wordt uitgevoerd in samenwerking met ervaren neurochirurgen. Eerst wordt een feasibility studie uitgevoerd met een klein aantal dieren (bijlage 2). Tijdens de feasibility studies worden de procedures van het aanbrengen van schade in de substantia nigra met MPTP in drie dieren en in de NBM met saporine in vier dieren getest. Eveneens wordt de procedure voor metingen van effecten van deze inductiemethodes getest, met onder andere EEG, gedrag en PET-scan. De uitkomst van de feasibility (haalbaarheids) studie (bijlage 2) bepaalt of een vervolg studie (bijlage 3) kan plaatsvinden (go/no go). Bij het PD model wordt dit bepaald aan de hand van de klinische observaties. Indien geen parkinson symptomen optreden zoals verminderde activiteit, apathy, tremoren of stijfheid, wordt waargenomen zal de vervolg studie (bijlage 3) geen doorgang vinden.
Bij het PDD model wordt dit bepaald aan de hand van de cognitieve verstoring die gemeten wordt met behulp van een cognitieve gedragstaak. Indien hier geen effect wordt waargenomen zal de vervolg studie (bijlage 3) geen doorgang vinden.

3.2.3 Zijn voor het uitvoeren van dit project andere wet en regelgeving van toepassing dat het welzijn van de dieren of de uitvoering van het project zou kunnen beinvloeden?
Nee, niet van toepassing

Referenties bij 3.1 en 3.2

1. Mehanna, R., Moore, S., Hou, J.G., Sarwar, A.I., Lai, E.C. (2014) Comparing clinical features of young onset, middle onset and late onset Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 20:530-534
2. Gasser, T. (2005) Genetics of Parkinson's disease. Curr Opin Neurol 18:363–369
3. Tolosa, E., Gaig, C., Santamaria, J. & Compta, Y. (2009). Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. Neurology, 72, S12-20
4. Jellinger, K.A. (2008). Neuropathological aspects of Alzheimer disease, Parkinson disease and frontotemporal dementia. Neurodegener Dis, 5, 118-121

1
0.
2.

6. Alexander, G.E. & Crutcher, M.D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. Trends Neurosci, 13, 266-271
7. Iranzo, A., Molinuevo, J.L., Santamaria, J., Serradell, M., Marti, M.J., Valldeoriola, F. & Tolosa, E. (2006). Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder as an early marker for a neurodegenerative disorder: a descriptive study. Lancet Neurol, 5, 572-577
8. 10.2.g

10. Jenner, P. (2003). The contribution of the MPTP-treated primate model to the development of new treatment strategies for Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord, 9, 131-137
11. Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W. & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science, 219, 979-980
12. Javitch, J.A., D'Amato, R.J., Strittmatter, S.M., Snyder, S.H. (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A, 82, 2173-2177
13. Schmidt, N. & Ferger, B. (2001). Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. J Neural Transm, 108, 1263-1282
14. Eslamboli, A. (2005). Marmoset monkey models of Parkinson's disease: which model, when and why? Brain Res Bull, 68, 140-149
15. Hardman, C.D., Henderson, J.M., Finkelstein, D.I., Horne, M.K., Paxinos, G. & Halliday, G.M. (2002). Comparison of the basal ganglia in rats, marmosets, macaques, baboons, and humans: volume and neuronal number for the output, internal relay, and striatal modulating nuclei. J Comp Neurol, 445, 238-255
16. 10.2.g

10.2.g

25. Bezard E, Przedborski S. A tale on animal models of Parkinson's disease. Mov Disord. 2011; 26:993–1002.
26. Fox SH, Brotchie JM. The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. Prog Brain Res. 2010; 184:133–157.
27. Fine A., Hoyle C., Maclean C.J., LeVatte T.L., Baker H.F., Ridley R.M. Learning impairments following injection of a selective cholinergic immunotoxin, ME20.4 IgG-saporin, into the basal nucleus of Meynert in monkeys, Neuroscience. 81 (1997) 331–343.
28. R.G. Wiley, R.H. Kline Iv, Neuronal lesioning with axonally transported toxins, 2000. www.elsevier.com/locate/jneumeth (accessed September 19, 2018).
29. Bohnen NI, Albin RL. White matter lesions in Parkinson disease. Nat Rev Neurol. 2011 7(4):229-36.
30. Liu R, J. Crawford, P.M. Callahan, A.V.J. Terry, C. Constantinidis, D.T. Blake, Intermittent Stimulation of the Nucleus Basalis of Meynert Improves Working Memory in Adult Monkeys., Curr. Biol. (2017).

10.2.g

32. Spinelli, S., Pennanen, L., Dettling, A.C., Feldon, J., Higgins, G.A., Pryce, C.R. (2004). Performance of the marmoset monkey on computerized tasks of attention and working memory. Brain Res Cogn Brain Res. 19(2):123-37
33. Philippens IH, Ormel PR, Baarends G, Johansson M, Remarque EJ, Doverskog M. Acceleration of Amyloidosis by Inflammation in the Amyloid-Beta Marmoset Monkey Model of Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 2017;55(1):101-113.
34. Vandehey NT, Garell PC, Hampel JA, Murali D, Smith EM, Davidson R, Converse AK, Nickles RJ, Christian BT (2009) PET measurement of changes in D2/D3 dopamine receptor binding in a nonhuman primate during chronic deep brain stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. J Neurosci Methods. 176(2):129-35.
35. Kringelbach M, Jenkinson N, Owen S, Aziz TZ. Translational principles of deep brain stimulation. Nature reviews. 2007; 8(8):623-35.

10.2.g

3.3 Belang

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

Alleen al 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 ouderdomsziekte 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 alleen de motorische 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 en bijwerkingen voor het medicijn en moet de patiënt tussendoor regelmatig overstappen op andere medicijnen. 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 resusaap Parkinsonmodel 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 de behandeling worden ontdekt. Deze informatie is van belang voor het verdere traject van de behandelmethode voor klinisch gebruik.

Verder is het onderzoek in de resusaap ook van belang voor het optimaliseren van DBS therapiëen. Dit geldt met name voor het behandelen van de cognitieve achteruitgang bij de ziekte van Parkinson (PDD). Ondanks eerdere positieve preklinische studies, blijkt er geen eenduidig effect op te treden binnen klinische trials/studies. Dit komt door een beperkte preklinische basis voor de translatie naar de kliniek [5].
De dierstudies zijn allen uitgevoerd met gezonde dieren zonder schade aan de NBM. Geen enkele studie heeft de relatie tussen de mate van cholinerge activatie na stimulatie van de NBM en de cognitieve verbetering laten zien. Tevens is er ook niet gekeken naar het stimulatie algoritme van de DBS in relatie tot het beoogde effect. Terwijl er aanwijzingen zijn dat het stimulatie patroon van groot belang is voor het effect. Een verkeerd gekozen stimulatie kan zelfs tot tegenovergestelde schadelijke effecten leiden. Daarom is het nodig om een stap terug te doen naar een preklinische studie om te onderzoeken wat het effect van verschillende stimulatie protocollen is. Dit kan niet in de mens omdat een verkeerd gekozen stimulatie een schadelijke uitwerking kan hebben. Bovendien, zal met het diermodel ook de ernst van de schade (vroege of late fase van de ziekte) in relatie tot het effect van de behandeling worden uitgezocht. Hierdoor kunnen in de toekomst patiënten geselecteert worden voor deze behandeling. Er is op dit moment geen inzicht in de relatie van slaagkans van NBM-DBS in relatie tot de ernst van het klinische beeld.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het project bestaat uit twee subdoelen: 1) Het evalueren van behandelmethodes tegen PD en 2) Het evalueren van behandelmethodes tegen PDD. Voor subdoel 1 wordt het MPTP-inductiemodel gebruikt. Voor subdoel 2 wordt het ME20.4-saporine-inductiemodel gebruikt.
Het project bestaat uit 3 projectonderdelen (bijlages). Bijlage 1 betreft bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapiën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen. Bijlage 2 betreft de haalbaarheidsstudie van de subdoelen. Bijlage 3 betreft de therapie evaluatie in het resusaap model. Alvorens een therapie evaluatie te kunnen uitvoeren (bijlage 3) is eerst een haalbaarheidsstudie met een klein aantal dieren nodig (bijlage 2) om de validiteit van het model te onderzoeken (go / no go moment). Indien de haalbaarheid vastgesteld kan worden kan met de therapie evaluatie in bijlage 3 begonnen worden (go moment). Indien de farmacokinetiek en dosis van het toe te passen geneesmiddel nog niet bekend is zal dit onderzocht worden aan de hand van bloedmonsters en op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen (bijlage 1).

Het project zal daarom starten met de haalbaarheidsstudie van bijlage 2.

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 resusapen (Bijlage 1):
Indien nog niet bekend, zal het nieuwe middel eenmalig worden ingespoten in gezonde resusapen 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 resusaap Parkinson-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 resusaap Parkinson-model.

Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel (Bijlage 2):
Voorafgaand aan een Parkinson studie in de resusaap zal de haalbaarheid van het toe te passen diermodel onderzocht worden met een klein aantal apen.
Subdoel 1) De motorische component van de ziekte van Parkinson wordt geïnduceerd met systemische MPTP injecties.
Subdoel 2) De cognitive component van de ziekte van Parkinson (Parkinson dementie) wordt geïnduceerd door locale intracraniale injecties in de NBM met ME20.4-saporine.
Ad 1) Het subacuut MPTP model wordt op basis van beschreven methodes in de literatuur gevalideerd in drie dieren. Het effect van herhaalde doseringen MPTP binnen een periode van 2 weken wordt gemeten aan de hand van activiteit gemeten met een actimeter en aan de hand van dagelijkse observatie van klinische symptomen zoals het optreden van stijfheid, tremoren, apathy en immobiliteit. Observatie vindt dagelijks plaats (ook in de weekenden) gedurende de periode waarin de injecties gegeven worden. Daarna worden de dieren alleen op de werkdagen geobserveerd. De dieren worden 6 weken gevolgd op ziekte progressie. Daarna worden ze geëuthaniseerd voor histologisch onderzoek naar schade in de substantia nigra.
Indien er een stabiel ziektebeeld op basis van Parkinsonsymptomen optreedt over een periode van 4 weken na de inductie, voldoet het model aan de criteria om ingezet te worden in een vervolgstudie. Indien symptomen uitblijven zal post-mortem onderzocht worden of dit het gevolg is van een te milde schade in de substantia nigra. Daarom zal eerst bij een dier het volledige proces doorlopen worden zodat bij de overige dieren de dosering van het MPTP kan worden aangepast. Indien er meer dan 60 % schade is in de substantia nigra maar geen Parkinsonsymptomen optreden zal een vervolgstudie niet plaatsvinden.

Ad 2) Voor het ME20.4-saporine inductie model zijn intracraniale injecties in de NBM nodig. Daarom is het van belang om in een haalbaarheidsstudie het injectie protocol en de dosering van saporine te onderzoeken. De injectie vindt plaats door middel van een stereotactische ingreep. De positiebepaling wordt gedaan aan de hand van een hersenatlas van de resusaap en wordt geverifieerd met behulp van een stimulatie elektrode die gelijktijdig met de injectienaald wordt in gebracht. Stimulatie met de stimulatie elektrode op de juiste plek (NBM) geeft een response op het EEG in de hersenschors. Eerdere studies toonden aan dat de corticale EEG-desynchronisatie wordt geïnduceerd door elektrische stimulatie in de NBM en dat dit verdwijnt wanneer de positie van de elektrode buiten de NBM valt [30].

Het effect zal worden gemeten aan de hand van veranderingen in cognitie en attentie en in het acetylcholine neurotransmissiesysteem met behulp van PET-scan, hersenactiviteit met behulp van electroencefalogram (EEG), en op het eind van de studie post-mortem histologie van de NBM en de cortex. Na de intracraniale injectie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd op klinische symptomen en worden geheugentaken uitgevoerd. Verder zal middels een PET-scan elke twee weken de hoeveelheid en de verdeling van acetylcholine in de hersenen worden gemeten om veranderingen door schade inductie te kunnen monitoren. Aan het eind van de haalbaarheidsstudie worden de dieren geëuthanaseerd voor histologisch onderzoek van het brein voor het achteraf verifiëren van de locatie van de injectie en elektrode positie en voor het meten van de schade in de NBM en cholinerge activiteit in de hersenschors hersenen.
Een eerste dier wordt gebruikt voor het testen van het effect van drie oplopende doseringen saporine getest op het effect van acetylcholine afgifte. De injectiecanule blijft samen met de stimulatie elektrode op de positie. Na de eerste PET-scan zal na afloop een herhaalde injectie met saporine worden gegeven. Dit

wordt nogmaals herhaald na twee weken (in totaal 3 injecties). Hierdoor kan daarna preciezer de dosis saporine worden vastgesteld in de volgende stap met n=3 dieren. Indien er bij deze drie dieren een verstoring van cognitie of attentie optreedt in relatie tot schade in de NBM, is de vervolg studie mogelijk. Indien er wel schade optreedt maar geen gedragsveranderingen worden waargenomen is een vervolgstudie niet mogelijk.

Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel (Bijlage 3):
Om de ziekte van Parkinson te induceren wordt MPTP systemisch toegediend bij resusapen in doseringen variërend tussen de 0,5-4 mg/kg. Het subacute model, waarbij de MPTP binnen een tijdspanne van 2 weken wordt toegediend, wordt gebruikt om anti-Parkinson middelen te testen. Dit zijn behandelingen die de symptomen onderdrukken. Indien een behandeling getest wordt die de progressie van de ziekte van Parkinson afremt wordt er gebruik gemaakt van een langzaam inductie protocol (chronisch model) waarbij een lage dosering van MPTP 1-2 maal per week gedurende meerdere weken wordt toegediend. Hierdoor is er een ruim tijdvenster waarin het effect op de progressie gemeten kan worden. Tijdens en na de inductiefase zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd op klinische symptomen behorend tot de ziekte van Parkinson en wordt de activiteit telemetrisch in de thuiskooi geregistreerd. Dit gebeurt middels een actimeter in een halsband of na implantatie onder de huid. Deze metingen vinden continue plaats (24-uurs metingen). Op deze manier kan gedurende het hele verloop van de studie veranderingen in activiteit worden gemeten.
Om Parkinson dementia te induceren worden resusapen intracraniaal geïnjecteerd met ME20.4-saporine in de NBM. Hierdoor raakt het cholinerge systeem verstoord waardoor een verminderd cognitief vermogen optreedt zoals bij de ziekte van Parkinson wat Parkinson-dementia wordt genoemd. Het effect op het cholinerge systeem wordt met behulp van een PET-scan gemeten. Alvorens de aap de PET-portaal ingaat wordt een dosis radiotracer intraveneus geïnjecteerd, om de mate van innervatie van het cholinerge systeem in de hersenen te meten. Deze inductie van cognitieve achteruitgang kan alleen óf in combinatie met de MPTP inductie worden toegepast. De cognitietaken bestaan uit complexe visuele discriminatietaken waarbij meerdere variabelen worden aangeboden. Te denken valt aan een kleur gerelateerd aan een positie. Bijvoorbeeld een rode schoenlepel mag alleen worden aangeraakt als deze in een horizontale positie wordt gepresenteerd en een blauwe als deze in een verticale positie wordt gepresenteerd. De juiste keuze van het dier wordt bekrachtigd door een klikkertraining met een positieve voedsel beloning. De dieren worden vooraf getraind op deze taken. Deze testen worden in de thuiskooi uitgevoerd.

Indien bloedmerkers gemeten moeten worden zal tijdens de dierproef een bloedmonster worden afgenomen. Voor en tijdens de studie zal middels een PET-scan, onder algehele anesthesie, de hoeveelheid en de verdeling van dopamine of acetylcholine in de hersenen worden gemeten om veranderingen door ziekte inductie en door de behandeling daartegen te kunnen monitoren.
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 of bij Parkinson-dementia. 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 resusaap Parkinsonmodel, moeten aan de volgende criteria voldoen:
1. Een medicijn mag niet zo 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 of target molecuul, maar zal ook in de resusaap hetzelfde target moeten herkennen.
3. Het beoogde target moet vanuit wetenschappelijk oogpunt een bijdrage leveren over de kennis van de ziekte van Parkinson of Parkinson-dementia. 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 behandeling kan niet afdoende worden getest in een ander diersoort vanwege beperkte validiteit in deze diermodellen. Te denken valt aan DBS vanwege de grotere spatiele resolutie in resusapen of 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 behandeling kan meteen in de resusaap getest worden (Bijlage 3) als er uit eerdere *in vivo* studies een indicatie is voor een behandelschema en indien de haalbaarheidsstudie (Bijlage 2, een go / no go moment) een positieve uitkomst heeft opgeleverd. In veel gevallen wordt een teststof door een externe partij aangeleverd om te testen in het Parkinsonmodel (Bijlage 3). 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 niet een geneesmiddel maar een nieuw aangrijpingspunt (target) voor behandeling onderzocht wordt. In dat geval zal het effect van een bekend geneesmiddel waarvan bekend is dat deze op dit target aangrijpt worden onderzocht. Het gaat dan niet om het geneesmiddel maar om het effect op het target. Hierdoor hopen we nieuwe aangrijpingspunten voor de behandeling van de ziekte van Parkinson te kunnen valideren. Indien de dosis of de PK niet bekend is van het middel zal eerst een PK/PD studie worden uitgevoerd (Bijlage 1).

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.
2	Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.
3	Therapie evaluatie in het resusaap Parkisonmodel.
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Dit is een 1 op 1 kopie van het CCD formulier, waarbij de invulvelden niet beveiligd zijn. Voor indiening bij de CCD moet de door de DEC goedgekeurde versie in het CCD formulier worden overgezet.
Versie CCD formulier dd. 2016-03-02

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 Typ: Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.

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 resusaap 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 3).
- In het geval van de dosis bepaling van de teststof wordt als primaire uitkomstparameter gekeken naar beïnvloeding van gedragsparameters die in de therapie evaluatiestudie (Bijlage 3) zullen worden gemeten. Dit om te voorkomen dat de teststof zelf de gedragsfunctie verstoord waardoor de resultaten in de therapie evaluatiestudie (Bijlage 3) moeilijk te interpreteren zijn. Vastgesteld wordt of en bij welke dosis beïnvloeding van de te meten parameter plaats vindt. De hoogste dosis die geen effect op deze gedragsparameters laat zien wordt gekozen voor de therapie evaluatiestudie (Bijlage 3). 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.

- Bloedafname of toediening van een teststof en bepaling van het lichaamsgewicht wordt gedaan onder anesthesie.
- 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. Wanneer mogelijk (in het geval van i.v., s.c., i.m., oraal) zal dit zonder sedatie worden uitgevoerd om het dier het ongerief van sedatie te besparen.
- Voor en na toediening wordt het gedrag van de dieren geobserveerd zoals activiteit en interesse in hun omgeving.
- Na de toedieningen zal bloed worden afgenomen. Dit kunnen meerdere bloedafnames zijn binnen een bepaalde tijdspanne na de toediening. Er wordt nooit meer dan 1% van het lichaamsgewicht aan bloed afgenomen binnen een tijdspanne van 4 weken. Tijdens de bloedafnames zullen de dieren ook worden gewogen.
- Indien directe effecten in de hersenen gemeten moeten worden dan zal de resusaap 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 of dosis bepaling zal bestaan uit een gelimiteerd aantal dieren (maximaal n=4 per groep) gebaseerd op ervaringen uit eerdere studies waaruit blijkt dat de farmacokinetiek profielen zeer consistent zijn tussen dieren, en vanwege het feit dat voor de dosisbepaling gedragsparameters worden meegenomen in de vaststelling van de hoogste dosis zonder bijwerkingen. Hierbij is rekening gehouden met verwachtte spreiding binnen het gedrag.
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 waar mogelijk. 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.

Resusaap (*Macaca mulatta*), volwassen (> 6 jaar), M/V, uit de eigen fokkolonie, n=16
Omdat de therapeutische studie (Bijlage 3) in volwassen resusapen wordt uitgevoerd, wordt ook voor de farmacokinetiek en de dosisbepaling de resusaap ingezet (> 6 jaar). Het aantal dieren per testgroep is 4. Geschatte aantal studies in 5 jaar is 2. Er zullen maximaal twee concentraties per therapie worden getest. In totaal zijn er dan 2 (aantal studies) x 2 (groepen) x 4 (dieren) = maximaal 16 resusapen 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 resusaap Parkinson-model. Een therapie kan meteen in het resusaap Parkinson-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 resusaap. Echter wanneer dit niet voldoende informatie oplevert voor een therapie evaluatie in het Parkinson-model, dient er voorafgaand aan een therapie evaluatie (Bijlage 3) eerst een farmacokinetiek en/of dosisbepaling op relevante gedrags biomerkers in de gezonde resusaap gedaan te worden. Op dit moment zijn er geen in vitro modellen (zoals cellijnen, organoïds) beschikbaar voor het resusaap 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 zo'n studie met vier dieren volstaan. Het leidt vooral tot vermindering van het aantal dieren in de daaropvolgende Parkinson-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. Waar mogelijk kunnen verschillende doseringen van een teststof in hetzelfde dier worden getest waardoor het aantal dieren minder zal zijn.

Verfijning
De dieren worden getraind om zo veel mogelijk vrijwillig mee te werken aan de experimentele handelingen zoals het geven van een verdoving of teststof toedieningen. De dieren worden altijd sociaal gehouden in een voor de resusaap 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 getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan invasieve biotechnische handelingen zoals het geven van een verdoving.

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 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.
Het maken van een gaatje in de schedel voor het i.c. injecteren van een teststof vindt plaats onder algehele anesthesie met peri-operationele pijnstilling. Pre- en postoperatief krijgen de dieren antibiotica. Ook in overige gevallen zal wanneer symptomen van pijn worden geobserveerd orale of parenterale pijnstilling worden toegediend na overleg met de veterinair.

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

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.

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 worden nauwlettend geobserveerd tijdens het bijkomen uit de sedatie.

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

Dit is een 1 op 1 kopie van het CCD formulier, waarbij de invulvelden niet beveiligd zijn. Voor indiening bij de CCD moet de door de DEC goedgekeurde versie in het CCD formulier worden overgezet.
Versie CCD formulier dd. 2016-03-02

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: Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit project omvat het valideren van een resusaapmodel voor de ziekte van Parkinson (PD) en voor Parkinson Dementie (PDD).
Deze modellen in de resusaap zullen vervolgens in studies worden toegepast om effecten van therapieën voor PD en PDD te testen (bijlage 3).
Deze modellen van PD en PDD zullen chemisch worden geïnduceerd met neurotoxinen. Deze toxinen zijn respectievelijk 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) en ME20.4-saporine.

1) MPTP is selectief voor dopamine producerende cellen en zal systemisch worden geïnjecteerd om schade aan te brengen aan de dopamineneuronen in de substantia nigra en dientengevolge symptomen van PD te induceren [1]. Voor de MPTP-studies gaan wij uit van de aanwezige kennis die is opgedaan in eerdere succesvol verlopen MPTP-studies in de marmoset [2-6].
2) ME20.4-saporine (hierna ook saporine genoemd) zal lokaal in de nucleus basalis van Meynert (NBM) worden geïnjecteerd om selectief schade aan te brengen in de daar aanwezige acetylcholine producerende cellen waarbij de acetylcholinerge deficiëntie-pathologie in PDD wordt nagebootst [7-8].

De dosis-effect relatie en de persistentie van symptomen die door de neurotoxische stoffen worden veroorzaakt, zullen tijdens een validatieonderzoek worden onderzocht.

Ad 1) In geval van het MPTP geïnduceerde model zal het effect worden gemeten aan de hand van veranderingen in het gedrag (Parkinsonsymptomen gemeten door gedragsobservaties, en activiteit gemeten met een actimeter) en post-mortem schade in de substantia nigra met behulp van histologische analyses. In het algemeen wordt er in resusstudies gebruik gemaakt van een subacuut inductie protocol waarin Parkinson symptomen snel optreden. Indien er een stabiel ziektebeeld op basis van Parkinsonsymptomen optreedt over

een periode van 4 weken na de inductie met een subacuut inductie protocol waarbij de MPTP binnen een periode van twee weken wordt toegediend, is de vervolgstudie mogelijk. Post-mortem zal blijken of het eventueel uitblijven van symptomen een gevolg is van een te milde schade. Daarom zal eerst bij een dier het volledige proces doorlopen worden zodat bij de overige dieren de dosering van het MPTP kan worden aangepast. Indien er meer dan 60% schade is in de substantia nigra maar geen Parkinsonsymptomen optreden, zal een vervolgstudie niet plaatsvinden.

Ad 2) In geval van het saporine geïnduceerde model zal het effect zal worden gemeten aan de hand van veranderingen in cognitie en attentie en in het acetylcholine neurotransmissiesysteem met behulp van *in vivo* positron emission tomography (PET)-CT-scans, hersenactiviteit met behulp van electroencefalogram (EEG), en op het eind van de studie post-mortem histologie van de NBM en de cortex. Een eerste dier wordt gebruikt voor het testen van het effect van drie oplopende doseringen saporine op het effect van acetylcholine afgifte. Hierdoor kan daarna preciezer de dosis saporine worden vastgesteld in de volgende stap met n=3 dieren. Indien er een verstoring van cognitie of attentie optreedt in relatie tot schade in de NBM, is de vervolg studie mogelijk. Indien er wel schade optreedt maar geen gedragsveranderingen is een vervolgstudie niet mogelijk.

De primaire uitkomstparameter is de mate van het optreden van klinische symptomen zoals immobiliteit, apathie, tremoren en stijfheid bij PD en cognitie en alertheid bij PDD. De verschillende verschijnselen van de Parkinson symptomen bij PD 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 gedragsobservaties die een goede maat vormen voor de ziekteprogressie. Deze klinische symptomen worden dagelijks gemonitord tijdens de ziekte inductie met MPTP en later minstens driemaal per week.
Daarnaast worden er als secundaire uitkomstparameters ook andere gedragsparameters gemeten zoals de activiteit, en het circadiane ritme. Activiteit en het circadiane ritme wordt gemeten met een actimeter (bij PD) of een implanteerbare transmitter die onder narcose onder de huid wordt geplaatst tijdens het aanbrengen van de intracraniale saporine injectie (bij PDD). Deze gedragsfuncties kunnen hierdoor op een standaard manier worden uitgevoerd zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator.
Voor de ziekte inductie worden de dieren eerst gehabitueerd aan gedragsopstellingen en daar waar nodig, zoals bij een cognitietaak, 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.
Tijdens de post-mortem histologie wordt de ernst van de schade in de hersenen onderzocht. Deze wordt bepaald door histologische kwantificatie van functionerende dopamine producerende cellen in de substantia nigra en van acetylcholine producerende cellen in de NBM en de cortex.

Andere parameters zijn:

1. Verlies van lichaamsgewicht
2. Verlies van motorfunctie gemeten, zoals activiteit, met gedragstest
3. Verstoorde circadiane ritme als gevolg van de ziekte van Parkinson middels elektro-encefalogram (EEG) en/of een actimeter.
4. PET- scan onder algehele anesthesie om de hoeveelheid aanwezige acetylcholine in de hersenen te meten. Hiervoor wordt een radioactief label, zoals bijvoorbeeld [^{18}F]fluoroethoxybenzovesamicol ([^{18}F]FEOBV), ingespoten, wat in acetylcholine producerende cellen wordt opgenomen en in de synaps van de nog functionerende cellen wordt uitgescheiden in het projectiegebied, zoals de cortex.

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.

De haalbaarheidsstudie van de resus Parkinsonmodellen PD en PDD bestaat uit injectie van de neurotoxines, gedragstesten en PET-CT-scan. Aan het eindpunt van de studie worden dieren geëuthanaseerd en worden de hersenen geïsoleerd en gefixeerd voor histologie.
Nadat het model voldoende succesvol gebleken is in de haalbaarheidsstudie kan het resus Parkinsonmodel voor PD of voor PDD worden toegepast voor preklinisch onderzoek naar PD/PDD-therapieën (bijlage 3). Het onderzoeksplan in deze fase (bijlage 3) zal worden bepaald aan de hand van het type behandeling met betrekking tot de onderzoeksvraag en zal per studie aan de IvD worden voorgelegd.

Neurotoxine-injectie

MPTP en saporine zijn de twee toxinen die zullen worden gebruikt om respectievelijk modellen van PD- en PDD-pathologie te moduleren. MPTP zal via een subacuut inductie protocol (herhaalde injecties binnen een tijdspanne van 2 weken) systemisch worden toegediend. MPTP passeert gemakkelijk de bloed-hersen barrière en is zeer selectief voor dopamine producerende cellen. De dosis MPTP wordt bepaald aan de hand van literatuur. De MPTP-model in de resusaap is een gevalideerd en veelvuldig toegepast model voor PD. Na de PD-inductie met MPTP worden de dieren gedurende een periode van 6 weken geobserveerd voor klinische symptomen en wordt de activiteit gemeten. Daarna worden ze geëuthanaseerd en de hersenen geïsoleerd voor verder histologisch onderzoek.

Saporine moet lokaal worden toegediend in de NBM met behulp van een stereotactische injectie. De chirurgische procedures zullen worden uitgevoerd onder algehele anesthesie. Een stereotact zal worden gebruikt om de positie van de naald te bepalen. De stereotactische coördinaten van de NBM worden verkregen uit de stereotactische resusaap-hersenenatlas [9] en met behulp van corticale afleiding van hersensignalen (EEG) na een elektrische stimulatie in de NBM door middel van een stimulatie-elektrode die gelijktijdig met de injectienaald via een boorgaatje in de schedel wordt ingebracht. Aangezien de NBM naar de hersenschors (cortex) projecteert is de reactie van een lokale stimulatie in de NBM in het EEG van de cortex terug te zien. Daarom wordt op twee locaties op de cortex EEG electroden aangebracht tijdens dezelfde chirurgische ingreep. Op deze wijze kan men controleren, middels de corticale EEG afleiding, of de naald op de juiste positie zit.
Bij het eerste dier dat wordt getest blijven de injectienaald en de stimulatie elektrode gedurende de studie aanwezig in de NBM. Hierdoor kan het effect van de aanwezigheid van een elektrode in de NBM op de kwaliteit van de PET-scan gemeten worden. Het biedt ook de mogelijkheid om bij dit dier tussendoor extra saporine te injecteren om het cummulatieve effect van herhaalde dosering te meten voor het optimaliseren van de saporine dosering. Dit gebeurt in beide hersenhelften. De overige drie dieren krijgen ieder een verschillende dosering saporine. Alle dieren krijgen na de operatie een herstelperiode van twee weken, waarna het effect van de ingreep wordt gecheckt met behulp van corticale EEG-meting en een PET-CT-scan met een ligand voor presynaptische cholinerge blaasjes (eenmaal per twee weken). Cognitie wordt 2 tot 3 keer per week getest met behulp van een gedragstaak: Standaard driemaal per week en tijdens een week waarin de PET-scan wordt gedaan tweemaal. De gedragsobservaties vinden 3 keer per week plaats. De gedragsobservaties vinden alleen plaats tijdens de werkdagen. Op de dagen van de PET-scan en de dag daarna vinden er geen gedragsobservaties of gedragstaken plaats. Tijdens iedere sedatie wordt het lichaamsgewicht gemeten.
De dieren worden gedurende elf weken na de saporine injectie gevolgd. Daarna worden ze geëuthanaseerd en de hersenen geïsoleerd voor verder histologisch onderzoek en verificatie van de locatie van de canule of injectienaald.

Gedragstesten

Gedragstesten worden uitgevoerd om het motorische en cognitieve functioneren voor en na ziekte inductie te evalueren. Het type van de toegepaste test kan variëren, afhankelijk van welk domein wordt geëvalueerd. Voor aanvang worden de dieren gehabitueerd aan de gedragsopstellingen en worden basiswaarden gemeten. De gedragsmetingen bestaan uit cognitietaken, activiteit in de thuiskooi, klinische gedragsobservaties (zoals apathie, tremoren, mobiliteit), slaap met behulp van activiteitsmetingen (in de PD studie) of van EEG-metingen (in de PDD studie). De cognitietaken bestaan uit complexe visuele discriminatie waarbij meerdere variabelen worden aangeboden. Te denken valt aan een kleur en positie. Bijvoorbeeld een rode schoenlepel mag alleen worden aangeraakt als deze in een horizontale positie wordt gepresenteerd en een blauwe als deze in een verticale positie wordt gepresenteerd. Niet alleen de correcte keuze, maar ook de snelheid van de keuze wordt gemeten (reactie tijd). De dieren worden vooraf getraind op deze taken. De taakverrichting tijdens training wordt gebruikt als basiswaarde voor elk afzondelijk dier. Deze testen worden in de thuiskooi uitgevoerd. Cognitieve verstoringen bij PDD zijn verschillend vergeleken met de verstoringen bij de ziekte van Alzheimer. Bij PDD patiënten is niet het aanleren van taken of de retrieval van aangeleerde taken een probleem. Deze patiënten hebben vooral last van dopamine onafhankelijke visuospatiele veranderingen en verlies van attentie. Dit betekent het onderscheiden van objecten, de relatie van de objecten ten opzichte van een positie, en de aandacht voor de taak [10]. Voor motorische functie wordt gebruik gemaakt van telemetrische metingen van de activiteit. Deze activiteit wordt eveneens in de thuiskooi geregistreerd. Dit kan via een actimeter in een halsband of na implantatie onder de huid worden gemeten. Deze metingen vinden continue plaats (24-uurs metingen). Op deze manier

kan gedurende het hele verloop van de studie veranderingen in activiteit worden gemeten. Op de dagen van sedatie voor bijvoorbeeld een PET-scan zal de data niet gebruikt worden.

EEG metingen

Om het ongerief zo veel mogelijk te beperken, wordt tijdens het inbrengen van de intracraniale injectienaald voor saporine toediening, door het veterinaire team een transmitter, voor telemetrische data acquisitie, met elektroden onder de huid of in de buikholte gebracht onder algehele anesthesie. De EEG-elektroden worden epiduraal in de schedel geplaatst en vastgezet met schroefjes en tandartscement. Pre- en postoperatief krijgen de dieren adequate pijnstilling om eventuele pijnervaringen als gevolg van de operatie tegen te gaan en antibiotica 1 dag voorafgaand aan de operatie en enkele dagen erna. EEG is onderdeel van de PDD-validatiestudie.

PET-CT

De PET-CT-procedures zullen worden uitgevoerd onder algehele anesthesie. Alvorens de aap de PET-portaal ingaat wordt een dosis radiotracer intraveneus geïnjecteerd, om de mate van innervatie van het dopaminerge of cholinerge systeem in de hersenen te meten. De aanwezigheid van EEG-elektroden vormt geen belemmering voor de PET scan. De scanacquisitie wordt binnen twee uur uitgevoerd, afhankelijk van welke radiotracer en type scanmethode wordt gebruikt. Deze apparatuur en expertise is aanwezig in de onderzoeksfaciliteit. Daarnaast wordt er samengewerkt met externe ervaren experts op PET scan onderzoek en analyses. Een PET-scan wordt in studies met het PDD-model standaard toegepast. Tijdens een PET-scan onder narcose wordt ook standaard het lichaamsgewicht gemeten.

Weefsel collectie

Aan het eindpunt van de studie zullen dieren onder sedatie worden geëuthanaseerd. Bloed wordt afgenomen en de hersenen zullen worden verwijderd en gefixeerd voor histologisch onderzoek. Afhankelijk van de histologische analyses op de hersenen worden de dieren vóór de euthanasie onder algehele narcose geperfuseerd.

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

Voor de validatie van het PD-model (met MPTP) worden drie dieren gebruikt. De dieren worden na elkaar ingezet zodat eventuele aanpassingen in de MPTP dosering mogelijk zijn.
Voor de validatie van PDD-model (saporine) worden vier dieren gebruikt. Eerst wordt met een dier het hele protocol doorlopen met oplopende doseringen saporine en de aanwezigheid van een de intracraniale elektrode tijdens de PET-scan. Daarna worden 3 dieren ingezet met ieder een verschillende dosis saporine.
Variabelen zijn de verwachte klinische symptomen, motorische beperking, cognitie.

Referenties:

1. D.C. German, M. Dubach, S. Askari, S.G. Speciale, D.M. Bowden, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonian syndrome in Macaca fascicularis: Which midbrain dopaminergic neurons are lost?, Neuroscience. 24 (1988) 161–174.

10.2.g

10.2.g

7. R. Liu, J. Crawford, P.M. Callahan, A.V.J. Terry, C. Constantinidis, D.T. Blake, Intermittent Stimulation of the Nucleus Basalis of Meynert Improves Working Memory in Adult Monkeys., Curr. Biol. (2017).
8. C. Blanco-Centurion, D. Gerashchenko, P.J. Shiromani, Effects of Saporin-Induced Lesions of Three Arousal Populations on Daily Levels of Sleep and Wake, J. Neurosci. 27 (2007) 14041–14048.
9. Paxinos, G., Huang, X. & Toga, A. W. (1999). The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, USA: Academic Press
10. Kehagia et al. Cognitive impairment in Parkinson's disease: The dual syndrome hypothesis Neurodegener Dis. 2012, 11(2):79-92.

B. De dieren

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

Volwassen resusapen (*Macaca mulata*) tussen 7 en 15 jaar, M/V, uit de eigen fokkolonie, n=7 (n=3 voor de MPTP validatie; n=4 voor de saporine validatie).

De leeftijd tussen 7 en 15 jaar oud is gekozen omdat de dieren binnen deze leeftijden geslachtsrijp zijn, het centrale zenuwstelsel volledig is ontwikkeld en gedragsverandering als gevolg van het verouderingsproces kan worden verwaarloosd [11].

Voor het onderzoek naar de motor symptomen in het MPTP model, kunnen beiden geslachten gebruikt worden. Voor het onderzoek naar Parkinson dementie wordt met voorkeur mannelijke apen gebruikt. Ondanks dat Parkinson dementia evenveel bij mannen als vrouwen voorkomt, is de cognitie gevoelig voor oestrogeen. Door alleen mannelijke dieren in te zetten willen we mogelijke uitkomstvariatie door de menstruatiecyclus minimaliseren [12].

De primaire reden om preklinisch onderzoek voor de ziekte van Parkinson uit te voeren met apen is vanwege de meer ontwikkelde hersenstructuren in vergelijking tot knaagdieren. Bijvoorbeeld het striatum, het eindpunt van de dopaminerge neuronen afkomstig uit de substantia nigra, is in zowel mensen als apen goed gedifferentieerd in twee gebieden, het putamen en de nucleus caudatus. Bij knaagdieren is dit een enkelvoudige structuur. Dit geldt ook voor de cholinergische kernen in de basale voorhersenen die bij mensen en apen niet alleen bestaat uit de NBM, maar ook uit het mediale septum. Onderzoek bij apen heeft de voorkeur als het onderzoek een hoge specificiteit voor één van deze cholinerge kernen vereist.
In de geschiedenis van Parkinson-onderzoek heeft de resusaap een grote bijdrage geleverd aan de ontwikkeling van DBS. De validatie en het onderzoek naar de onderliggende mechanismen in de resusaap heeft ten grondslag gelegen aan de toepassing van DBS in de mens [13].

Referenties:

11. G.S. Roth, J.A. Mattison, M.A. Ottinger, M.E. Chachich, M.A. Lane, D.K. Ingram, Aging in rhesus monkeys: Relevance to human health interventions, Science (80-.). 305 (2004) 1423–1426.
12. A. Lacreuse, Effects of ovarian hormones on cognitive function in nonhuman primates, Neuroscience. 138 (2006) 859–867. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.09.006.
13. Tass PA1, Qin L, Hauptmann C, Dovero S, Bezard E, Boraud T, Meissner WG. The translational value of the MPTP non-human primate model of Parkinsonism for deep brain stimulation research. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2011;2011:663-6. doi: 10.1109/IEMBS.2011.6090148.

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 plaatsvinden 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
Deze haalbaarheidsstudie is bedoeld voor het optimaliseren en valideren van het MPTP model voor PD en van het saporine model voor PDD in de resusaap (bijlage 3). Daarom vervalt hier het mogelijk gebruik van in vitro methodes of onderzoek in knaagdieren. Het gebruik van het resusaapmodel bij Parkinson-onderzoek is veel toegepast en uitgebreid gevalideerd.
Het gebruik van apen bij PD/PDD-onderzoek dient vooral als een preklinische evaluatie van nieuwe therapieën voordat klinische trials in patiënten worden gestart. Aangezien de resusaap een grote aapsoort is, is de resusaap geschikt voor het plaatsen van DBS-elektroden en het aanbrengen van lokale laesies in specifieke kleine hersenkernen.

Vermindering
Voordat deze Parkinson modellen worden ingezet in studies is het van belang dat de haalbaarheid is onderzocht. Pas bij een positief resultaat (het kunnen induceren van de ziekte van Parkinson of de cognitieve achteruitgang zoals bij de ziekte van Parkinson optreedt), kan een studie worden gestart. Voor de haalbaarheid wordt het uiterst minimaal aantal dieren van n=3 bij het MPTP model en n=4 bij het saporine model, gebruikt. In de feasibility studie van het saporine model wordt eerst met een dier het effect van oplopende doseringen saporine op het effect van acetylcholine afgifte getest. Hierdoor kan daarna preciezer de dosis saporine in de volgende stap met n=3 dieren worden vastgesteld.
Door een longitudinale studie over meerdere weken toe te passen waarbij dieren gedurende een langere periode worden gevolgd met behulp van gedragsobservatie en neuroimaging kan het aantal dieren worden beperkt. Het gebruik van *in vivo* PET-CT-scan zal informatie opleveren over veranderingen in acetylcholine producerende cellen en hun receptoren over de tijd binnen dezelfde dieren. Dit bespaart veel dieren in vergelijking met een conventionele postmortem studie waarbij voor hetzelfde resultaat meer dieren zijn vereist. De gedrags- en PET-CT-scan veranderingen na ziekte inductie worden met de eigen oorspronkelijke performance (nulwaarden) vergeleken. Bovendien leidt het uitvoeren van meerdere verschillende testen in hetzelfde dier tot vermindering van het aantal proefdieren.

Verfijning
Voor de resusaap zijn diverse meetsystemen voorhanden om gedragsfuncties te kwantificeren. Deze functies kunnen op een standaard manier worden gemonitord zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Deze metingen kunnen plaatsvinden in de thuiskooi. Een voorbeeld is de 24-uurs activiteit middels een actimeter. Een ander voorbeeld is het meten van de hersenactiviteit (EEG) waarbij een implanteerbare transmitter voor draadloze metingen wordt gebruikt waardoor de aap vrij kan bewegen. De procedure voor het aanbrengen van EEG-elektrodes is in eerdere studies verfijnd, waardoor de uitval van dieren door technische problemen sterk verminderd is [12]. Het gebruik van de PET-CT-scan maakt het mogelijk om veranderingen in de hersenen over de tijd binnen het afzonderlijke dier te kunnen volgen. Hiervoor moest voorheen een dier geëuthanaseerd worden om dit post-mortem histologisch te kunnen meten. Voor het meten van de cognitie worden de apen eerst 'gehabitueerd' aan de opstelling en daarna stapsgewijs voor de taak

getraind. Doordat verschillende parameters in hetzelfde dier worden getest, is een nauwkeurigere meting van het effect van een behandeling mogelijk. Dit lijdt tot verfijning en draagt tevens bij tot een nauwkeuriger bepaling van humane eindpunten.

Referenties:

10
.2.
g

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 zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan biotechnische handelingen zoals het toedienen van een injectie. 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 cognitietaak).

Operaties: De operaties vinden plaats onder algehele anesthesie. Na een operatie wordt een postoperatieve herstelperiode van minstens twee weken toegepast. Na een intracraniale injectie wordt na twee weken met behulp van een PET-CT-scan de effectiviteit van de ingreep gecheckt. Analgesie zal pre- en postoperatief worden gegeven. Bovendien zal lokale anesthetica worden toegediend op de plaats van de chirurgische incisie. Als er tijdens dagelijkse algemene observaties tekenen van pijn, ontsteking of infectie zijn, zullen er pijnstillers en/of antibiotica worden gegeven. PET-CT-scan meting vindt plaats onder algehele anesthesie.

Welzijn: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente dierverzorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag dan wordt de veterinair hiervan op de hoogte gesteld om te beoordelen of ingrijpen nodig is om ongerief tot een minimum te beperken.

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.

n.v.t.

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. Ook ervaren patiënten met een DBS geen pijn of ongerief van de aanwezigheid van een verblijfselektrode in de hersenen en de onderhuids-geplaatste stimulator. Wel ondervinden patiënten last van de verminderde controle over hun motorfuncties en cognitieve achteruitgang. 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 het i.c. injecteren van saporine en het inbrengen van een elektrode voor stimulatie voor plaatsbepaling van de i.c. injectie met saporine vindt plaats onder algehele anesthesie met peri-operationele pijnstilling om eventuele pijnervaringen tegen te gaan.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. ongerief door een operatieve ingreep voor de intracraniale elektrode of -injectie met ME20.4-saporine
2. ongerief door sedatie en ontwaken uit sedatie
3. ongerief door klinische Parkinson-symptomen en dementie
4. ongerief door verlies van eetlust na toediening van MPTP
5. ongerief door verstoring van het circadiane ritme door schade in de NBM
6. ongerief door PET/CT procedure
7. ongerief door hersteloperatie na loslaten van corticale EEG elektroden

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Vanwege de invasieve aard van de stereotactische ingreep voor de intracraniale injectie en het plaatsen van een intracraniale elektrode zal deze ingreep resulteren in een aantasting van het welzijn. Daarbij kan een post-operatieve infectie optreden als gevolg van een niet-intacte huid na chirurgische incisie.
2. Het ontwaken uit sedatie kan een gevoel van desorientatie geven.
3. Parkinsonisme leidt tot symptomen als apathie, mindere bewegelijkheid, tremoren en stijfheid. Het verlies van motorfuncties kan als stressvol worden ervaren. Daarnaast leidt PDD tot een verminderd cognitief vermogen waardoor het geheugen is aan getast. Dit kan tot verwarring leiden.
4. Het probleem met voedselinname wordt voornamelijk waargenomen bij dieren die zijn geïnjecteerd met het MPTP-toxine. MPTP vermindert de dopaminerge neurotransmissie, waardoor als gevolg ook de voedingsmotivatie vermindert.
5. Bekend is dat de basale cholinergische voorhersenen een rol spelen bij het circadiane ritme. Schade in de NBM door injectie met saporine kan daarom het circadiane ritme van het dier verstoren [8].
6. Aangezien de PET-CT scan procedure onder sedatie wordt uitgevoerd zal het ongerief beperkt blijven. Wel zal het dier hierdoor een gevoel van desorientatie na het ontwaken kunnen ervaren.
7. In eerdere studies met marmosetapen kwam het voor dat EEG electroden loslieten. Dit kwam voornamelijk door een slechte binding van het cement en de schedel.

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

1. De ingrepen worden verricht onder een multi-modale anesthesie. Profylactisch zal bij de intracraniale injectie peri-operatief antibiotica worden toegediend. Ongerief van incisie plaatsen zal naar verwachting licht zijn. Pijnmedicatie zal worden toegepast.
2. De bijverschijnselen na sedatie kunnen niet worden geantagoneerd. Wel worden de dieren 16-18 uur voor aanvang van de procedure nuchter gehouden om te voorkomen dat ze overgeven en aspireren na sedatie.
3. We werken met een cumulatieve discomfort schaal van de klinische symptomen. Dieren worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.
4. Indien nodig worden de dieren bijgevoerd met calorierijk voedsel om ernstig gewichtsverlies te voorkomen.
5. Deze verandering van het circadiane ritme wordt als een extra parameter gezien om de progressie van het ziektebeeld en herstel hiervan te kunnen volgen. Met behulp van een actimeter kan het circadiane ritme in de tijd gevolgd worden.
6. De dieren worden 16-18 uur voor aanvang van de PET-CT scan nuchter gehouden om te voorkomen dat ze overgeven tijdens de sedatie.
7. De schedel van de resusaap is veel dikker dan die van de marmosetaap waardoor sterkere botschroeven gebruikt kunnen worden voor hechting van de elektroden in de schedel. Deze betere schroeven, in combinatie met cement, zullen de kans op loslaten aanzienlijk verminderen. Als dit toch gebeurt dan zal een herstel operatie ingepland 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.

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 achtereenvolgende 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 (interesse in de omgeving), immobiliteit, alertheid, tremoractiviteit. Deze symptomen worden gescoord op een schaal van 0 (niet waargenomen), 1 (waargenomen maar onderdeel van normaal gedrag), 2 (waargenomen in een lichte vorm), 3 (duidelijk waargenomen), en 4 (waargenomen in een ernstige vorm).

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

De kans is klein dat deze criteria worden behaald vanwege het hanteren van de klinische scoringstabel en toepassen van humane eindpunten op basis van deze score en de huidige ervaring het bereiken van ernstig ongerief. Wij streven ernaar om geen uitval van dieren na de MPTP-toedieningen te krijgen door PD te induceren via herhaalde MPTP-injecties (maximaal 1 injectie per dag) waarbij tussen de injecties het klinische beeld wordt gevolgd waarbij de dosering van de MPTP afgesteld kan worden (0,5-4 mg/kg).
Om uitval door saporine te voorkomen wordt tijdens de haalbaarheidsstudie eerst bij een dier oplopende doseringen geïnjecteerd met een tussen periode van 2 weken. Daarna wordt bij 3 dieren elk een verschillende dosering geïnjecteerd waarna de schade over de tijd wordt gemeten in het brein met behulp van de PET-CT-scan met een tracer voor acetylcholine. De meest optimale dosis waarbij er wel schade is maar er ook nog cellen in de NBM intact zijn wordt toegepast in de volgende studies. De dosering-range wordt aan de hand van de literatuur bepaald. De kans op het behalen van dit criterium is verwaarloosbaar en daarom <5 %.

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.

Een essentieel onderdeel is uitgebreid onderzoek naar de pathologie in de hersenen. Om dit onderzoek te kunnen doen is het noodzakelijk de dieren te euthanaseren.

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

Dit is een 1 op 1 kopie van het CCD formulier, waarbij de invulvelden niet beveiligd zijn. Voor indiening bij de CCD moet de door de DEC goedgekeurde versie in het CCD formulier worden overgezet.
Versie CCD formulier dd. 2016-03-02

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: Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel.

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 resusaapmodel voor de ziekte van Parkinson (PD) en Parkinson Dementie (PDD).

In de beginfase van het project zullen we methoden ontwikkelen en valideren om PD en PDD bij resusapen te moduleren. Deze gevalideerde modellen in de resusaap zullen vervolgens in studies worden toegepast om effecten van therapieën voor PD en PDD te testen.
Deze modellen van PD en PDD zullen chemisch worden geïnduceerd met neurotoxinen. Deze toxinen zijn respectievelijk 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) en ME20.4-saporine.

1) MPTP is selectief voor dopamine producerende cellen en zal systemisch worden geïnjecteerd om schade aan te brengen aan de dopamineneuronen in de substantia nigra en dientengevolge symptomen van PD te induceren [1]. Voor de MPTP-studies gaan wij uit van de aanwezige kennis die is opgedaan in eerdere succesvol verlopen MPTP-studies in de marmoset [2-6].
2) ME20.4-saporine (hierna saporine genoemd) zal lokaal in de nucleus basalis van Meynert (NBM) worden geïnjecteerd om selectief schade aan te brengen in de daar aanwezige acetylcholine producerende cellen, waarbij de cholinerge deficiëntie-pathologie in PDD wordt nagebootst [7-8].

De dosis-effect relatie en de persistentie van symptomen die door het saporine worden veroorzaakt, zullen tijdens een validatieonderzoek worden onderzocht. Het effect zal worden gemeten aan de hand van veranderingen in het gedrag en in het neurotransmissiesysteem met behulp van *in vivo* positron emission tomography (PET)-CT-scans. Bovendien zullen dieren op het eindpunt van de studie worden geëuthanaseerd voor post-mortem pathologie van de hersenen.

De gebruikte *in vivo* PET-CT-scan methode en de post-mortem pathologie zal in daaropvolgende studies op vergelijkbare wijze worden uitgevoerd om de effecten van een therapie te evalueren. Daarbij zal in een of meerdere groepen dieren de experimentele behandeling worden toegediend en in een groep dieren een controle behandeling.

De primaire uitkomstparameter is de mate van het optreden van klinische symptomen zoals immobiliteit, apathie bij PD en PDD en daarnaast tremoren en stijfheid bij alleen PD. 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. Deze klinische symptomen worden dagelijks gemonitord tijdens de ziekteinductie en later minstens driemaal per week. Daarnaast is cognitie en alertheid een belangrijke parameter bij PDD. Beiden worden getest tijdens een cognitietaak. Tijdens de taak wordt de reactiesnelheid gemeten als een maat voor alertheid.
Voor veel van de cognitietaken is de prefrontale cortex van belang die vooral bij mensen en apen goed ontwikkeld is. Deze gedragsfuncties kunnen op een standaard manier worden uitgevoerd zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Daarnaast worden er als secundaire uitkomstparameters ook andere gedragsparameters gemeten zoals de activiteit en het circadiane ritme. Activiteit en het circadiane ritme wordt gemeten met een implanteerbare transmitter die onder narcose onder de huid wordt geplaatst.
Voor de ziekteinductie worden de dieren eerst gehabitueerd aan gedragsopstellingen en daar waar nodig, zoals bij een cognitietaak, getraind. Van alle gedragstaken worden basiswaarden gemeten van het, dan nog, naïeve dier. Tijdens en na ziekteinductie worden deze gedragstaken herhaald uitgevoerd om het verloop (progressie) van de ziekte te kunnen volgen en het effect van een behandeling te kunnen meten.
Tijdens de post-mortem pathologie wordt de ernst van de schade in de hersenen onderzocht. Deze wordt bepaald door histologische kwantificatie van functionerende dopamine producerende cellen in de substantia nigra en van acetylcholine producerende cellen in de NBM.

Andere parameters kunnen zijn:

1. Verlies van lichaamsgewicht
2. Afwijkende hematologie en bloedchemie
3. Verlies van motorfunctie gemeten, zoals activiteit, met gedragstest
4. Slaapstoornis en verstoorde circadiane ritme als gevolg van de ziekte van Parkinson middels elektro-encefalogram (EEG) en/of een actimeter.
5. PET- scan in het gesedeerde dier, onder algehele anesthesie, om de hoeveelheid aanwezige dopamine of acetylcholine in de hersenen te meten. Hiervoor wordt een radioactief label, zoals bijvoorbeeld [^{18}F]6-fluoro-DOPA (F-DOPA), ingespoten, wat in dopamine producerende cellen via de dopamine transporter wordt opgenomen en in de synaps van de nog functionerende cellen wordt uitgescheiden in het projectiegebied, zoals het striatum.

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.

Het onderzoeksplan zal worden bepaald aan de hand van het type behandeling met betrekking tot de onderzoeksvraag en zal per studie aan de IvD worden voorgelegd. Een studie wordt alleen ingezet als er voldoende aanwijzingen zijn uit eerdere dierstudies dat de behandeling een gunstig effect zou kunnen hebben zonder dat er ernstige bijwerkingen optreden.

<u>Neurotoxine-injectie</u>
MPTP en saporine zijn de twee toxinen die zullen worden gebruikt om respectievelijk modellen van PD- en PDD-pathologie te moduleren. Afhankelijk van de vraagstelling van de studie kunnen de toxines afzonderlijk worden toegediend of gecombineerd.
- MPTP passeert gemakkelijk de bloed-hersen barrière en is zeer selectief voor dopamine producerende cellen. MPTP zal via een subacuut inductie protocol (herhaalde injecties binnen een tijdspanne van 2 weken) systemisch worden toegediend om anti-Parkinson middelen te testen. Dit zijn behandelingen die de symptomen onderdrukken. Indien een behandeling getest wordt die de progressie van de ziekte van Parkinson afremt wordt er gebruik gemaakt van een langzaam inductie protocol (chronisch model) waarbij een lage dosering van MPTP 1-2 maal per week gedurende meerdere weken wordt toegediend. Hierdoor is er een ruim tijdvenster waarin het effect op de progressie gemeten kan worden. Het MPTP protocol zonder

saporine wordt bij de resusaap gebruikt wanneer eerdere experimenten, waarmee de resultaten vergeleken moeten worden, ook in de resusaap hebben plaatsgevonden.
- Saporine moet lokaal worden toegediend in de nucleus basalis van Meynert (NBM). De lokale injectie van saporine in de NBM vereist een chirurgische techniek, zogenaamde stereotactische chirurgie, om het toxine precies in de NBM te lokaliseren en te injecteren. De chirurgische procedures zullen worden uitgevoerd onder algehele anesthesie. Een stereotact zal worden gebruikt om de positie van de naald te bepalen. De stereotactische coördinaten van de NBM worden verkregen uit de stereotactische resusaap-hersenenatlas [10] en, indien nodig, aanvullend met behulp van op neuroimaging gebaseerde navigatie (zoals bv CT-scan) of met behulp van corticale afleiding van hersensignalen (EEG) na een stimulatie in de NBM. Samen met de injectienaald wordt een stimulatie-elektrode ingebracht. Aangezien de NBM naar de hersenschors (cortex) projecteert is de reactie van een lokale stimulatie in de NBM in het EEG van de cortex terug te zien. Op deze wijze kan men controleren of de naald op de juiste positie zit. Met behulp van de stereotactische coördinaten van de NBM, wordt de naald door een boorgaatje in de schedel ingebracht (eventueel samen met een stimulatie elektrode voor positiebepaling). Dit gebeurt in beide hersendelen. Saporine zal lokaal via de naald worden geïnjecteerd in de NBM. De dieren krijgen na de operatie een herstelperiode van twee weken, waarna het effect van de ingreep wordt gecheckt met behulp van een PET-CT-scan met een ligand voor presynaptische cholinergeblaasjes. Met deze scan kan de afname van de corticale innervatie aangetoond worden. Twee weken na deze check, starten de gedragsmetingen en de DBS stimulatie, waarbij de dieren gevolgd zullen worden op klinische symptomen door observatie, gedragsveranderingen en met behulp van PET-CT-scans. Hieronder staat een voorbeeld hoe zo'n test schema eruit zou kunnen zien (Figuur 1). Controle dieren zullen een zogenaamde sham-operatie ondergaan onder vergelijkbare procedures, zonder dat de toxine wordt geïnjecteerd.

Weeks: 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Test week A	Test week A	surgery		PET-CT scan check		Test week A	Test week B	Test week A	Test week B	Test week A
							Deep brain stimulation			

Test week A

Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
observation	cognition	observation bodyweight PET-scan		observation

Test week B

Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
observation	cognition	observation		observation

Figuur 1: Voorbeeld van hoe een testschema voor een studie eruit kan zien. De eerste twee weken worden gebruikt voor het verzamelen van de basiswaarden van elk dier. Tijdens iedere sedatie wordt het lichaamsgewicht gemeten. De observaties vinden alleen plaats tijdens de werkdagen.

<u>Gedragstesten</u>
Gedragstesten worden uitgevoerd om het motorische en cognitieve functioneren voor en na ziekteinductie en tijdens of na toediening van een behandeling te evalueren. Het type van de toegepaste test kan variëren, afhankelijk van welk domein wordt geëvalueerd. Voor aanvang worden de dieren gehabituerd aan de gedragsopstellingen en worden basiswaarden gemeten. De gedragsmetingen bestaan uit cognitietaken, activiteit in de thuiskooi, klinische observaties (zoals apathie, tremoren, eetlust, mobiliteit), slaap met behulp van activiteitsmetingen of van EEG-metingen. De cognitietaken bestaan uit complexe visuele discriminatie waarbij meerdere variabelen worden aangeboden. Te denken valt aan een kleur en positie. Bijvoorbeeld een rode schoenlepel mag alleen worden aangeraakt als deze in een horizontale positie wordt gepresenteerd en een blauwe als deze in een verticale positie wordt gepresenteerd. De dieren worden vooraf getraind op deze taken. Deze testen worden in de thuiskooi uitgevoerd. Voor motorische functie wordt gebruik gemaakt van telemetrische metingen van de activiteit. Deze activiteit wordt eveneens in de thuiskooi

geregistreerd. Dit kan via een actimeter in een halsband of na implantatie onder de huid worden gemeten. Deze metingen vinden continue plaats (24-uurs metingen). Op deze manier kan gedurende het hele verloop van de studie veranderingen in activiteit worden gemeten. Op de dagen van sedatie voor bijvoorbeeld een PET-scan zal de data niet gebruikt worden.

EEG metingen

Aangezien bij neurologische aandoeningen de hersenactiviteit kan veranderen en zowel PD als PDD het circadiane ritme verstoren, is de hersenactiviteit (gemeten met EEG) een parameter om de ziekteinductie en het effect van de therapie hierop te kunnen meten. Voor het meten van het EEG, o.a. voor slaapanalyses, wordt voor aanvang van de studie onder algehele anesthesie, door het veterinaire team een transmitter, voor telemetrische data acquisitie, met elektroden onder de huid of in de buikholte gebracht. De EEG-elektroden worden in de schedel geplaatst en de EMG-elektroden (elektro-myogram voor het meten van spierspanning) in spierweefsel van de nek en schouder (t.b.v. het identificeren van de droom(REM)-slaap). Indien in hetzelfde dier ook een stimulatie elektrode voor DBS moet worden geplaatst wordt deze ingreep tijdens dezelfde operatie uitgevoerd om het ongerief zo veel mogelijk te beperken. Pre- en post-operatief krijgen de dieren adequate pijnstilling om eventuele pijnervaringen als gevolg van de operatie tegen te gaan en antibiotica 1 dag voorafgaand aan de operatie en enkele dagen erna. Per studie wordt bepaald of deze parameter onderdeel is van de studie en wordt met de IvD afgestemd.

PET-CT

De PET-CT-procedures zullen worden uitgevoerd onder algehele anesthesie. Alvorens de aap de PET-portaal ingaat wordt een dosis radiotracer intraveneus geïnjecteerd, om de mate van innervatie van het dopaminerge of cholinerge systeem in de hersenen te meten. De aanwezigheid van EEG-elektroden vormt geen belemmering voor de PET scan. De scanacquisitie wordt binnen twee uur uitgevoerd, afhankelijk van welke radiotracer en type scanmethode wordt gebruikt. Deze apparatuur en expertise is aanwezig in de onderzoeksfaciliteit. Daarnaast wordt er samengewerkt met externe ervaren experts op dit gebied. Eerst wordt een feasibility studie uitgevoerd met drie dieren waarbij de procedure van het aanbrengen van schade in de NBM en het meten van het effect in de PET-CT scan met een ligand voor presynaptische cholinergeblaasjes wordt getest. Een PET-scan wordt in studies met het PDD model standaard toegepast. Verder wordt per studie bepaald of deze parameter onderdeel is van de studie en wordt met de IvD afgestemd. Tijdens een PET-scan onder narcose wordt ook standaard het lichaamsgewicht gemeten.

Weefsel collectie

Vóór de ziekte inductie wordt er onder sedatie bloed afgenomen voor het bepalen van individuele nulwaarden. Aan het eindpunt van de studie zullen dieren onder sedatie worden geëuthanaseerd. Bloed wordt afgenomen en de hersenen zullen worden verwijderd en gefixeerd voor pathologische studies. Afhankelijk van de pathologische analyses op de hersenen worden de dieren in voorkomende gevallen vóór de euthansie onder algehele narcose geperfuseerd.

Behandeling

Een behandeling bestaat uit elektrische stimulatie (DBS) van een bepaald hersengebied, zoals de NBM bij PDD-patiënten. Hiervoor wordt, op eenzelfde manier als bij het toedienen van intracraniaal toxine zoals hierboven beschreven onder 'Neurotoxine-injectie', een elektrode met behulp van een stereotact in het betreffende hersengebied geplaatst. Deze elektrode is bevestigd aan een stimulator die onderhuids wordt geplaatst, zoals bij patiënten wordt toegepast.

Naast elektrische stimulatie kunnen ook nieuwe geneesmiddelen (teststof) worden onderzocht op hun werkzaamheid. De toedieningsroute van teststof of controlepreparaat wordt per studie bepaald en is afhankelijk van de aard van de teststof. Afhankelijk van de toedieningsroute zal de teststof of controlepreparaat 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 (na positive reinforcement training) worden uitgevoerd om het dier het ongerief van sedatie te besparen.

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 6 resusapen per groep. Dit is afhankelijk van de te testen therapie en de statistische poweranalyse. Uit resultaten van eerdere Parkinson-studies met marmosetapen 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 uitleesparameter. De standaarddeviatie (SD) en de effect size (ES) van de klinische gedragsscore wordt geschat, op basis van de uitkomsten van de vooraf uit te voeren validatiestudie, 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 PD of PDD 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.
Om neuronale effecten (zoals bijvoorbeeld neurogenese, eiwit analyse of transcriptomics) in de hersenen te kunnen vergelijken met de gezonde situatie wordt in studies, waarbij dit een onderdeel is, ook een naïeve groep (negatieve controlegroep waarbij geen PD of PDD wordt geïnduceerd) meegenomen (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 of aan de NBM 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 of apen die om andere redenen worden geëuthaniseerd.

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

Referenties:

1. D.C. German, M. Dubach, S. Askari, S.G. Speciale, D.M. Bowden, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonian syndrome in Macaca fascicularis: Which midbrain dopaminergic neurons are lost?, Neuroscience. 24 (1988) 161–174.

10.2.g

7. R. Liu, J. Crawford, P.M. Callahan, A.V.J. Terry, C. Constantinidis, D.T. Blake, Intermittent Stimulation of the Nucleus Basalis of Meynert Improves Working Memory in Adult Monkeys., Curr. Biol. (2017).
8. C. Blanco-Centurion, D. Gerashchenko, P.J. Shiromani, Effects of Saporin-Induced Lesions of Three Arousal Populations on Daily Levels of Sleep and Wake, J. Neurosci. 27 (2007) 14041–14048.

9. Guy W (1976) ECDEU assessment manual for psychopharmacology. Washington DC: US Department of Health, Education and Welfare; pp. 534–537
10. Paxinos, G., Huang, X. & Toga, A. W. (1999). The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, USA: Academic Press

B. De dieren

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

Volwassen resusapen (*Macaca mulata*) tussen 7 en 15 jaar, M/V, uit de eigen fokkolonie, n=48

De leeftijd tussen 7 en 15 jaar oud is gekozen omdat de dieren binnen deze leeftijden geslachtsrijp zijn, het centrale zenuwstelsel volledig is ontwikkeld en gedragsverlies als gevolg van het verouderingsproces kan worden verwaarloosd [11].

Er wordt geschat dat er de komende 5 jaar in totaal 3 nieuwe of herziene behandelmethoden plaats zullen vinden. Geschatte aantal studies is dus 3. Een studie zal worden uitgevoerd met een geschat aantal van 6 resusapen per groep en 2 tot 3 groepen per studie. Geschat wordt dat 1 studie uit 2 groepen zal bestaan ((1 studie x 2 groepen + 2 studies x 3 groepen) x 6 dieren = ((2+6) x 6) = 48 dieren).
In alle gevallen wordt er een negatieve controle groep (met de ziekte inductie zonder behandeling) in een studie meegenomen. Een studie bestaat uit 3 groepen indien er twee verschillende doseringen van een teststof getest worden. Drie groepen zijn ook nodig wanneer naast het te testen medicijn ook een medicijn met een bekent effect als positieve controle wordt meegenomen.

Voor het onderzoek naar de motor symptomen in het MPTP model, kunnen beiden geslachten gebruikt worden. Voor het onderzoek naar Parkinson dementie wordt met voorkeur mannelijke apen gebruikt. Ondanks dat Parkinson dementia evenveel bij mannen als vrouwen voorkomt, is de cognitie gevoelig voor oestrogeen. Door alleen mannelijke dieren in te zetten willen we mogelijke uitkomstvariatie door de menstruatiecyclus minimaliseren [12].

De primaire reden om preklinisch onderzoek voor de ziekte van Parkinson uit te voeren met apen is vanwege de meer ontwikkelde hersenstructuren in vergelijking tot knaagdieren. Bijvoorbeeld het striatum, het eindpunt van de dopaminerge neuronen afkomstig uit de substantia nigra, is in zowel mensen als apen goed gedifferentieerd in twee gebieden, het putamen en de nucleus caudatus. Bij knaagdieren is dit een enkelvoudige structuur. Dit geldt ook voor de cholinergische kernen in de basale voorhersenen die bij mensen en apen uit een gedifferentieërde NBM bestaat [13]. Onderzoek bij apen heeft de voorkeur als het onderzoek een hoge specificiteit voor één van deze cholinerge kernen vereist. Voor veel van het Parkinson-onderzoek wordt de marmoset als aapmodel gebruikt. Dit is een kleine aapsoort met veel voordelen als model voor de ziekte van Parkinson. Echter in voorkomende gevallen is de marmosetaap te klein voor het onderzoek. Dit speelt wanneer er veel bloed moet worden afgenomen of wanneer er een hoge spatiele resolutie wordt vereist voor het plaatsen van bijvoorbeeld DBS-elektroden. Ook zal afhankelijk van de teststof de resusaap ingezet worden. Indien eerdere studies naar een bepaalde teststof in de resusaap zijn uitgevoerd, kunnen de resultaten beter vergeleken worden als hetzelfde diermodel wordt gebruikt.
In de geschiedenis van Parkinson-onderzoek heeft de resusaap een grote bijdrage geleverd aan de ontwikkeling van DBS. De validatie en het onderzoek naar de onderliggende mechanismen in de resusaap heeft ten grondslag gelegen aan de toepassing van DBS in de mens.

<u>Referenties</u>:
11. G.S. Roth, J.A. Mattison, M.A. Ottinger, M.E. Chachich, M.A. Lane, D.K. Ingram, Aging in rhesus monkeys: Relevance to human health interventions, Science (80-.). 305 (2004) 1423–1426.
12. A. Lacreuse, Effects of ovarian hormones on cognitive function in nonhuman primates, Neuroscience. 138 (2006) 859–867. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.09.006.
13. Mesulam MM, Mufson EJ, Levey a I, Wainer BH. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. J Comp Neurol. 1983;214(2):170–97

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 plaatsvinden 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 functieverlies. 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. Doordat de klinisch relevante Parkinson-symptomen niet spontaan verdwijnen in de aap-modellen voor de ziekte van Parkinson, is de aap 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. Als aap model wordt de marmosetaap, de cynomolgusaap en de resusaap gebruikt binnen dit onderzoeksveld. Het gebruik van het resusaapmodel bij Parkinson-onderzoek is veel toegepast en uitgebreid gevalideerd.

Het gebruik van apen bij PD/PDD-onderzoek dient vooral als een preklinische evaluatie van nieuwe therapieën voordat klinische trials in patiënten worden gestart. Aangezien de resusaap een grotere aapsoort is dan de marmosetaap, is de resusaap geschikter voor het plaatsen van DBS-elektroden en het aanbrengen van lokale laesies in specifieke kleine hersenkernen. Een soortgelijke studie met DBS in de NBM is eerder toegepast in de resusaap echter in gezonde apen zonder dat dementie-verschijnselen waren geïnduceerd [14]. Onderzoek naar een nieuwe behandeling voor PDD in het resusaapmodel zal de translationele waarde van een therapie verhogen voordat deze wordt toegepast bij Parkinson-patiënten lijdend aan dementie. Dit kan nog niet direct in de mens worden toegepast omdat het optimale frequentiepatroon van de stimulatie nog niet bekend is. Ook is nog niet bekend wat de neveneffecten van verschillende stimulatie algoritmen zijn op de hersenen. Tot nu toe wordt alleen een continue stimulatie met lage frequentie (20-50 Hz) aangeboden. Deze vorm van stimulatie heeft waarschijnlijk een negatief effect [14] waardoor er ook geen eenduidige resultaten gevonden worden. Een klinische trial met 6 patiënten is om deze reden mislukt [15]. Daarom is het nodig om een stap terug te doen naar een preklinische studie om te onderzoeken wat het effect van verschillende stimulatie protocollen is. Dit kan niet in de mens omdat een verkeerd gekozen stimulatie een schadelijke uitwerking kan hebben. Bovendien, zal met het diermodel ook de ernst van de schade (vroege of late fase van de ziekte) in relatie tot het effect van de behandeling worden uitgezocht.

Vermindering
Voordat een geneesmiddel 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. Een behandeling wordt daarna verder in de aap onderzocht om de vertaalslag naar de mens te vergroten.
Door een longitudinale studie toe te passen waarbij dieren gedurende een langere periode worden gevolgd met behulp van gedrags- en neuroimagingobservatie kan het aantal dieren worden beperkt. Het gebruik van *in vivo* PET-CT-scan zal informatie opleveren over veranderingen in dopamine en acetylcholine producerende cellen en hun receptoren over de tijd binnen dezelfde dieren. Dit bespaart veel dieren in vergelijking met een conventionele postmortem observatie waarbij voor hetzelfde resultaat meer dieren zijn vereist.
Het aantal benodigde dieren wordt per experiment bepaald aan de hand van power-analyse. Het minimaal aantal benodigde dieren zal worden gebruikt. Om het aantal dieren te verminderen wordt voor de selectie van de dieren van tevoren het gedrag van elk dier gemeten, zodat de groepen gelijke basiswaarden vertonen. De gedrags- en PET-CT-scan veranderingen na ziekteinductie en na behandeling worden daarna met de eigen oorspronkelijke performance (nulwaarden) vergeleken. Bovendien leidt het uitvoeren van meerdere verschillende testen in hetzelfde dier tot vermindering van het aantal proefdieren.

Verfijning
Voor de resusaap zijn diverse meetsystemen voorhanden om gedragsfuncties te kwantificeren. Deze functies kunnen op een standaard manier worden gemonitord zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Deze metingen kunnen plaatsvinden in de thuiskooi. Een voorbeeld is de 24-uurs activiteit en de lichaamstemperatuur middels een implanteerbare transmitter. Een ander voorbeeld is het meten van de hersenactiviteit (EEG), voor het meten van bijvoorbeeld slaap, waarbij eveneens een implanteerbare transmitter voor draadloze metingen wordt gebruikt waardoor de aap vrij kan bewegen. Voor zowel de temperatuur, activiteit als het EEG kan dezelfde transmitter worden gebruikt. De procedure voor het aanbrengen van EEG-elektrodes is in eerdere studies verfijnd, waardoor de uitval van dieren door technische problemen sterk verminderd is [16]. Het gebruik van de PET-CT-scan maakt het mogelijk om veranderingen in de hersenen over de tijd binnen het afzonderlijke dier te kunnen volgen. Hiervoor moest voorheen een dier geëuthaniseerd worden om dit post-mortem histologisch te kunnen meten. Voor het meten van de cognitie worden de apen eerst 'gehabituueerd' aan de opstelling en daarna stapsgewijs voor de taak getraind. Doordat verschillende parameters in hetzelfde dier worden getest, is een nauwkeurigere meting van het effect van een behandeling mogelijk. Dit lijdt tot verfijning en draagt tevens bij tot een nauwkeuriger bepaling van humane eindpunten.

Referenties:

14 R. Liu, J. Crawford, P.M. Callahan, A.V.J. Terry, C. Constantinidis, D.T. Blake, Intermittent Stimulation of the Nucleus Basalis of Meynert Improves Working Memory in Adult Monkeys., Curr. Biol. (2017).

15 Gratwicke et al, JAMA Neurol. 2018, vol 75: 169

16 10.2.g

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 zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan invasieve biotechnische handelingen zoals het toedienen van een injectie of het afnemen van bloed. Verder worden de dieren eerst gehabituueerd aan de gedragsopstellingen zodat ze op een vertrouwde wijze de gedragstaken kunnen uitvoeren en daar waar nodig getraind (bijvoorbeeld bij een cognitietaak).

Operaties: De operaties vinden plaats onder algehele anesthesie. Na een operatie wordt een postoperatieve herstelperiode van minstens twee weken toegepast. Na een intracraniale injectie wordt na twee weken met behulp van een PET-CT-scan de effectiviteit van de ingreep gecheckt. Analgesie zal pre- en postoperatief worden gegeven. Bovendien zal lokale anesthetica worden toegediend op de plaats van de chirurgische incisie. Als er tijdens observaties tekenen van pijn, ontsteking of infectie zijn, zullen er pijnstillers en/of antibiotica worden gegeven. PET-CT-scan meting vindt plaats onder algehele anesthesie.

Welzijn: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente dierverzorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag dan wordt de veterinair hiervan op de hoogte gesteld om te beoordelen of ingrijpen nodig is om ongerief tot een minimum te beperken.

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.

n.v.t.

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. Ook ervaren patiënten met een DBS geen pijn of ongerief van de aanwezigheid van een verblijfselektrode in de hersenen en de onderhuids-geplaatste stimulator. Wel ondervinden patiënten last van de verminderde controle over hun

motorfuncties en cognitieve achteruitgang. 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 het i.c. injecteren van saporine en het inbrengen van een elektrode voor DBS vindt plaats onder algehele anesthesie met peri-operationele pijnstilling om eventuele pijnervaringen tegen te gaan.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. ongerief door een operatieve ingreep voor de intracraniale stimulatie-elektrode of – saporine-injectie
2. ongerief door sedatie en ontwaken uit sedatie
3. ongerief door klinische Parkinson-symptomen en dementie
4. ongerief door verlies van eetlust na MPTP
5. ongerief door verstoring van het circadiane ritme door schade in de NBM
6. ongerief door PET/CT procedure
7. ongerief door hersteloperatie na loslaten van corticale EEG elektroden

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Vanwege de invasieve aard van de stereotactische ingreep voor de intracraniale injectie en het plaatsen van een intracraniale elektrode zal deze ingreep resulteren in een aantasting van het welzijn. Daarbij kan een post-operatieve infectie optreden als gevolg van een niet-intacte huid na chirurgische incisie.
2. Het ontwaken uit sedatie kan een gevoel van desorientatie geven.
3. Parkinsonisme leidt tot symptomen als apathie, mindere bewegelijkheid, tremoren en stijfheid. Het verlies van motorfuncties kan als stressvol worden ervaren. Daarnaast leidt PDD tot een verminderd cognitief vermogen waardoor het geheugen is aan getast. Dit kan tot verwarring leiden.
4. Het probleem met voedselinname wordt voornamelijk waargenomen bij dieren die zijn geïnjecteerd met het MPTP-toxine. MPTP vermindert de dopaminerge neurotransmissie, waardoor als gevolg ook de voedingsmotivatie vermindert.
5. Bekend is dat de basale cholinergische voorhersenen een rol spelen bij het circadiane ritme. Schade in de NBM door injectie met saporine kan daarom het circadiane ritme van het dier verstoren [8].
6. Aangezien de PET-CT scan procedure onder sedatie wordt uitgevoerd zal het ongerief beperkt blijven. Wel zal het dier hierdoor een gevoel van desorientatie na het ontwaken kunnen ervaren
7. In eerdere studies met marmosetapen kwam het voor dat EEG elektroden loslieten. Dit kwam voornamelijk door een slechte binding van het cement en de schedel.

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

1. De ingrepen worden verricht onder een multi-modale anesthesie. Profylactisch zal bij de intracraniale injectie peri-operatief antibiotica worden toegediend. Ongerief van incisie plaatsen zal naar verwachting licht zijn. Pijnmedicatie zal worden toegepast.
2. De bijverschijnselen na sedatie kunnen niet worden geantagoneerd. Wel worden de dieren 16-18 uur voor aanvang van de procedure nuchter gehouden om te voorkomen dat ze overgeven en aspireren na sedatie.
3. We werken met een cumulatieve discomfort schaal van de klinische symptomen. Dieren worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.
4. Indien nodig worden de dieren bijgevoerd met calorierijk voedsel om ernstig gewichtsverlies te voorkomen.
5. Deze verandering van het circadiane ritme wordt als een extra parameter gezien om de progressie van het ziektebeeld en herstel hiervan te kunnen volgen. Met behulp van een actimeter kan het circadiane ritme in de tijd gevolgd worden.
6. De dieren worden 16-18 uur voor aanvang van de PET-CT scan nuchter gehouden om te voorkomen dat ze overgeven tijdens de sedatie.
7. De schedel van de resusaap is veel dikker dan die van de marmosetaap waardoor sterkere botschroeven gebruikt kunnen worden voor hechting van de elektroden in de schedel. Door het tandartscement in dunne lagen aan te brengen versnelt het droogproces en daardoor het hechtingsproces. Deze betere schroeven, in combinatie met cement, zullen de kans op loslaten aanzienlijk verminderen. Als dit toch gebeurt dan zal een herstel operatie ingepland 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.

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 achtereenvolgende 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 (interesse in de omgeving), immobiliteit, alertheid, tremoractiviteit. Deze symptomen worden gescoord op een schaal van 0 (niet waargenomen), 1 (waargenomen maar onderdeel van normaal gedrag), 2 (waargenomen in een lichte vorm), 3 (duidelijk waargenomen), en 4 (waargenomen in een ernstige vorm).

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

De kans is klein dat dit criteria worden behaald vanwege het hanteren van de klinische scoringstabel en toepassen van humane eindpunten op basis van deze score en de huidige ervaring het bereiken van ernstig ongerief. Wij streven ernaar om geen uitval van dieren na de MPTP-toedieningen te krijgen door PD te induceren via herhaalde MPTP-injecties (maximaal 1 injectie per dag) waarbij tussen de injecties het klinische beeld wordt gevolgd waarbij de dosering van de MPTP afgesteld kan worden (0,5-4 mg/kg). Om uitval door saponine te voorkomen wordt tijdens de eerste validatiestudie 3 verschillende doseringen geïnjecteerd waarna de schade wordt gemeten in het brein met behulp van de PET-CT-scan met een tracer voor acetylcholine. De meest optimale dosis waarbij er wel schade is maar er ook nog cellen in de NBM intact zijn wordt toegepast in de volgende studies. De dosering-range wordt aan de hand van de literatuur bepaald. De kans op het behalen van dit criterium is verwaarloosbaar en daarom <5 %.

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.

Een essentieel onderdeel is uitgebreid onderzoek naar de pathologie in de hersenen. Om dit onderzoek te kunnen doen is het noodzakelijk de dieren te euthanaseren.

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

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: AVD5020020186345

2. Titel van het project: Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie in de resus aap

3. Titel van de NTS: Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie in de resus aap

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

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

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☒ ontvangen door DEC: 31-08-2018
   - ☒ aanvraag compleet: 31-08-2018
   - ☒ in vergadering besproken: 07-09-2018 en 11-10-2018
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☒ termijnonderbreking(en) van 13-09-2018 tot 03-10-2018 en 15-10-2018 tot 24-10-2018 en van 29-10-2018 tot 31-10-2018
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☒ aanpassing aanvraag: 03-10-2018, 24-10-2018 en 31-10-2018
   - ☒ advies aan CCD: 1-11-2018

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

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum: 13-09-2018, 15-10-2018 en 29-10-2018
   - Gestelde vraag/vragen: Gezien het feit dat Deep Brain Stimulation (DBS) reeds bij mensen is toegepast werd aanvullende argumentatie gevraagd omtrent de noodzaak om resus apen te gebruiken voor onderzoek naar het therapeutisch effect van deze techniek op de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie. Aanvullend werd gevraagd om een nadere omschrijving van de criteria waaraan kandidaat geneesmiddelen moeten voldoen om in aanmerking te komen voor evaluatie in dit diermodel en of er geen PK/PD studies nodig zou zijn om de juiste dosering en het toedieningsschema te bepalen. Tevens werd gevraagd om aanvullende informatie betreffende proefopzet, de opzet van het in het projectvoorstel vermelde pilot-experiment, de biotechnische handelingen en gedragstesten, de keuze om mannetjes te gebruiken voor onderzoek naar Parkinson dementie en het ongerief.
     In de tweede vragenronde werd de onderzoeker geïnformeerd dat naar de mening van de DEC DBS voor behandeling van motorische symptomen bij de ziekte van Parkinson reeds uitgebreid bij mensen wordt toegepast en dus niet nader onderzocht hoeft te worden. De DEC was echter wel overtuigd, mede door de door de onderzoeker aangereikte argumenten, van het belang van nader onderzoek in resus apen voor behandeling van Parkinson dementie d.m.v. DBS. Verder werd gevraagd om een nadere omschrijving van de te volgen strategie bij de haalbaarheidsstudie (de nieuwe bijlage 2), de geschiktheid van de beschreven gedragstest om cognitieve verstoringen bij Parkinson dementie te meten, nadere uitleg omtrent het aantal proefgroepen bij de therapie evaluatie studies (de nieuwe bijlage 3) en om enkele tekstuele aanpassingen. Op 29-10-2018 werd gevraagd om nadere uitleg over het gebruikte MPTP inductie model.
   - Datum antwoord: 03-10-2018, 24-10-2018 en 31-10-2018
   - Verstrekt(e) antwoord(en): Het projectvoorstel is ingrijpend gewijzigd naar aanleiding van de vragen van de DEC. Er zijn twee bijlages toegevoegd. In de nieuwe bijlage 1 zijn nu PK/PD studies beschreven om de juiste dosering van de te testen therapie vast te kunnen stellen indien noodzakelijk. In de nieuwe bijlage 2 is het eerder summier aangegeven pilot experiment nader uitgewerkt en van een beslismoment voorzien. Het maximaal benodigde aantal dieren is hierdoor noodzakelijkerwijs toegenomen. Bijlage 3 beschrijft de evaluatie van behandelmethodes (was oorspronkelijk bijlage 1). De noodzaak om DBS als therapie verder te optimaliseren in resus apen werd nader onderbouwd. De proefopzet is nader uitgewerkt met name in het projectvoorstel en in bijlage 2. In bijlage 3 is aanvullende informatie opgenomen over de biotechnische handelingen, gedragstesten en de keuze om mannetjes apen te gebruiken voor onderzoek naar Parkinson dementie. In een schriftelijk antwoord werd de inschatting van het ongerief als zijnde “matig” uitgelegd. Hierbij werd aangevoerd dat de gedragsmetingen allen plaats vinden vanuit de thuiskooi, dat door toepassing van telemetrie het aantal sedaties beperkt wordt en dat bekend is dat het plaatsen van een stimulatie elektrode voor DBS in de hersenen, naast de EEG elektrodes, geen extra ongerief geeft.
     In de op 24-10-2018 ingediende tweede versie van de aangepaste aanvraag is het testen van DBS voor behandeling van motorische symptomen bij de ziekte van Parkinson uit de aanvraag verwijderd. In bijlage 2 is de te volgen strategie nader omschreven en de te gebruiken

gedragstest voor het meten van cognitie nader onderbouwd. In bijlage 3 is het benodigde aantal proefgroepen verder uitgelegd. De tekst is op diverse plaatsen aangepast.
In de op 31-10-2018 ingediende derde versie werd aanvullende informatie verstrekt over het MPTP inductie model.

- 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 neurologische aandoeningen, de neurofysiologische (EEG) en gedragsparameters die hier gebruikt gaan worden, DBS, farmacologie, 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, hetgeen belangrijk is voor een juiste beoordeling van de hier voorgestelde experimenten in het resus 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 heeft als hoofddoel bij te dragen aan behandeling van de ziekte van Parkinson, zowel wat betreft de motorische verschijnselen als de Parkinson dementie. Het betreft het testen in resus apen van de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes tegen enerzijds de ziekte van Parkinson en anderzijds tegen Parkinson dementie. Het onderzoek bestaat uit drie onderdelen, te weten 1) bepaling van de dosis waarin de potentieel nieuwe behandelmethodes getest moeten gaan worden en het effect op relevante biomerkers, 2) een haalbaarheidsstudie voor zowel het resusaap Parkinsonmodel als het Parkinsondementie model 3) *in vivo* evaluatie van de effectiviteit van potentieel nieuwe behandelmethodes tegen de ziekte van Parkinson en tegen Parkinson dementie. Bij dit onderzoek wordt enerzijds gebruik gemaakt van het MPTP inductie model, waarmee met name schade wordt aangebracht aan de dopamineneuronen in de substantia nigra hetgeen resulteert in celdood en klinische symptomen behorende bij de ziekte van Parkinson zoals verstoorde motorfunctie, tremoren, apathie en verminderde gelaatsuitdrukking. Anderzijds wordt gebruik gemaakt van injectie van ME20.4-saporine in de basale kern van Meynert, hetgeen

resulteert in verslechtering van cognitieve symptomen karakteristiek voor Parkinson dementie. De te testen behandelmethodes betreffen zowel nieuwe geneesmiddelen als behandelingen zoals DBS. De te gebruiken ziekte inductie methodes zijn specifiek toegespitst op de te behandelen ziektebeelden behorende bij de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie en zijn noodzakelijk om het hoofddoel te bereiken. De te testen potentiele behandelmethodes zijn veelal ontwikkeld op basis van wetenschappelijke inzichten in mogelijke werkingsmechanismen en specifieke aangrijpingspunten. De subdoelen sluiten logisch aan bij het hoofddoel en vormen met elkaar een samenhangend geheel. Eerst wordt een haalbaarheidsstudie uitgevoerd, waarin bepaald wordt of het gebruikte ziekte inductie model de gewenste ziektebeelden oproept en wordt het inductie protocol geoptimaliseerd. Deze fase dient als een go/no go voor evaluatie van kandidaat geneesmiddelen in dit diermodel, zoals beschreven in bijlage 3. Indien onvoldoende gegevens beschikbaar zijn voor het vaststellen van de juiste dosis van de te testen therapie zal eerst een PK/PD studie worden gedaan, zoals beschreven in bijlage 1.

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 behandelmethodes tegen de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie *in vivo* onderzocht op hun therapeutisch effect tegen de verschijnselen van de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie.

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 evalueren van nieuwe potentiele behandelmethodes op effectiviteit tegen de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie in het resus apen model waarin de symptomen van Parkinson zijn geïnduceerd door toediening van de neurotoxische stof MPTP en de cognitieve symptomen behorend bij Parkinson dementie zijn geïnduceerd door injectie van ME20.4-saporine in de basale kern van Meynert. Het uiteindelijke doel is het bijdragen aan het beschikbaar komen van betere geneesmiddelen tegen de ziekte van Parkinson en het optimaliseren van de DBS behandelmethode voor Parkinson dementie. 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 en die bovendien alleen de motorische symptomen van de ziekte onderdrukken. 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 bij Parkinson dementie behorende verschijnselen) en reductie in pathologie (PET-CT gedurende de studie en 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 zijn de te behandelen personen, samenleving, 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. Bovendien zijn deze medicijnen vooral gericht op het onderdrukken van de motorische symptomen en niet werkzaam tegen complicaties, zoals ernstige depressie, slaapverstoring en cognitieve achteruitgang. Deze complicaties hebben een ernstig nadelig effect op het welzijn en functioneren van de patiënt. Alleen met het beschikbaar komen van nieuwe behandelmethodes 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 hetgeen 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, operatieve ingrepen ondergaan en 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) met name over welke behandelingen wel en welke niet effectief zijn in deze modellen. De modellen hebben predictieve validiteit: m.a.w. positieve uitkomsten in deze modellen zullen zeker bijdragen tot goede klinische trials bij de mens. Dit onderzoek kan daarom leiden tot ontwikkeling van nieuwe behandelmethodes tegen de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie en tot meer inzicht in de werkingsmechanismen van deze methodes, evenals 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. De onderzoeker heeft een grote expertise op het gebied van de ziekte van Parkinson en jarenlange ervaring met onderzoek naar deze ziekte en het evalueren van nieuwe therapieën in het marmoset MPTP model, inclusief het toepassen van geavanceerde uitleessystemen voor neurologische aandoeningen. Alhoewel er binnen het instituut nog niet eerder gewerkt is met het resus MPTP model is er veel ervaring met het gebruik van resus apen in biomedisch onderzoek en is dit model internationaal een veel toegepast en goed gevalideerd model. Dit onderzoek wordt uitgevoerd in samenwerking met ervaren neurochirurgen.

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. Naast het meten van klinische symptomen behorende bij de ziekte van Parkinson, zoals immobiliteit, apathie, tremoren en stijfheid worden ook diverse

gedragsparameters, zoals activiteit, het circadiane ritme en cognitie gemeten, waarvan met name recente publicaties aannemelijk gemaakt hebben dat de cognitieve stoornissen veroorzaakt worden door de aangetaste cholinerge projecties van de NB van Meynert naar de cortex, en dus van belang zijn voor Parkinson dementie.
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. Eerst wordt een haalbaarheidsstudie uitgevoerd om vast te stellen of de te gebruiken ziekte inductie methodes het voor vervolgstudies noodzakelijke ziektebeeld oproepen (bijlage 2). Hierbij worden tevens de inductiemethodes geoptimaliseerd. De resultaten uit deze studie vormen een voorwaarde (go/no go) voor het gebruik van dit model voor evalueren van nieuwe behandelmethodes tegen de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie. Indien onvoldoende gegevens beschikbaar zijn om een juiste dosering voor de te testen therapie te kunnen kiezen en dergelijke informatie ook niet uit studies in andere diersoorten verkregen kan worden wordt eerst een PK/PD studie uitgevoerd (bijlage 1), voorafgaand aan de therapie evaluatie studie (bijlage 3).

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 een niet humane primaten soort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor inductie van sterk op de ziekte van Parkinson gelijkende verschijnselen en het feit dat het model chronisch is, waardoor het effect van potentiele therapieën op specifieke ziekte symptomen en het verloop van de ziekte bestudeerd kunnen worden, dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld knaagdiermodellen. De specifieke keuze voor de resus aap in plaats van de marmoset betreft enerzijds het testen van therapieën die vanwege de grote specificiteit voor de mens hun aangrijpingspunt niet in de marmoset, maar wel in de resus aap herkennen (door de grotere evolutionaire verwantschap met de mens). Anderzijds betreft het behandelmethodes waarbij specifiek in bepaalde gebieden in de hersenen een injectie moet plaats vinden of elektrodes moeten worden geplaatst. De hersenen van de marmoset zijn te klein om dit nauwkeurig te kunnen doen, vandaar dat voorgesteld wordt dit onderzoek in de grotere resusaap uit te voeren. 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 te testen behandelmethodes 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 en wordt veroorzaakt door de experimentele technieken, de toegepaste behandelmethodes en de klinische symptomen ten gevolge van het induceren van de ziekte. 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 waardoor het ongerief tot matig beperkt blijft. 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 studies worden gebruikt wordt aangetast door de toediening van de geneesmiddelen en door frequente bloedafnames. Deze aantastingen van de integriteit zijn 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 nieuwe behandelmethodes wordt getest wordt aangetast door de dieren te behandelen met MPTP waardoor symptomen van de ziekte van Parkinson zullen optreden of door de toediening van ME20.4-saporine in de basale kern van Meynert, hetgeen zal leiden tot verschijnselen die lijken op Parkinson dementie. De dieren zullen operaties ondergaan voor de injectie van het ME20.4-saporine, het aanbrengen van een electrode voor DBS en het aanbrengen van een transmitter voor telemetrische data acquisitie. Door de symptomen van de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie 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. Bereiken van een humaan eindpunt wordt zoveel mogelijk vermeden door aanpassing van de dosering van MPTP indien nodig. Het is niet de verwachting, dat de met saporine behandelde dieren de motorische verschijnselen zullen krijgen en dat de symptomen beperkt blijven tot verminderde alertheid, cognitieve problemen en verstoorde slaap-waak ritmiek en daarom is de verwachting dat in deze experimenten geen humaan eindpunt bereikt zal worden. Tevens wordt in een pilot studie de dosering van MPTP en ME20.4-saporine geoptimaliseerd om uitval door te veel schade in vervolgstudies te voorkomen. Tijdens de studies naar nieuwe manieren van behandelingen in het MPTP model zullen de dieren nauwlettend en frequent geobserveerd worden aan de hand van goed gevalideerde klinische schalen en kan voorkomen worden dat het humane eindpunt bereikt wordt door tijdig euthanasie toe te passen.

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 en Parkinson dementie geëvalueerd op hun werkzaamheid in resus 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 kunnen de cognitieve veranderingen die kenmerkend zijn voor Parkinson dementie worden gemodelleerd door injectie van ME20.4-saporine in de basale kern van Meynert. Modellen voor de ziekte van Parkinson in

andere dieren (muis, kat en rat) zijn wel beschreven maar komen aanzienlijk minder goed overeen met de humane ziekte, zijn niet chronisch en ook de structuur van de hersenen en werking van geneesmiddelen is anders in andere diersoorten. Het marmoset MPTP model vertoont vele overeenkomsten met het resus MPTP model, maar is niet geschikt voor het testen van therapieën die niet kruisreageren met het doel-moleculen in de marmoset (maar wel in de resus aap) of wanneer specifiek bij de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie betrokken hersengebieden moeten worden geïnjecteerd of daar elektrodes in moeten worden aangebracht. Door de experimenten in resus apen 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 lijkt in dit stadium van de ontwikkeling van de potentiele therapieën dan ook niet verantwoord. DBS wordt reeds bij mensen toegepast voor de behandeling van motorische symptomen van de ziekte van Parkinson. Echter voor toepassing van DBS voor behandeling van cognitieve symptomen bij de mens is momenteel onvoldoende kennis aanwezig. Onderzoek in resus apen is nodig om het benodigde stimulatie algoritme en het mogelijk therapeutisch effect te bepalen. Toepassing van DBS zonder deze kennis kan leiden tot tegenovergestelde en dus schadelijke effecten en dit kan daarom niet direct in de mens onderzocht worden.

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/PD studies wordt tot een minimum beperkt gegeven dat gedrag ook een uitleesparameter is en deze studies worden alleen uitgevoerd als *in vitro* studies of *in vivo* studies met knaagdieren niet de juiste of afdoende gegevens kunnen leveren. Overigens wordt wel gebruik gemaakt van gegevens uit *in vitro* studies of *in vivo* studies met knaagdieren waar het gaat om dosering en doseringsschema in de PK/PD studie. Het aantal dieren dat in de pilot haalbaarheid studie wordt gebruikt is het minimale aantal nodig om de juiste dosering van MPTP en ME20.4-saporine vast te kunnen en deze fase is nodig voor optimaliseren van het model. Het aantal benodigde dieren voor de *in vivo* evaluatie van de effectiviteit van potentiele behandelmethodes wordt bepaald met behulp van statische powerberekeningen op basis van gegevens uit voorgaande experimenten. Er zullen zoveel mogelijk parameters gemeten worden om het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk te beperken.

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. De metingen zullen zoveel mogelijk plaatsvinden in de thuiskooi van het dier en zullen deels plaatsvinden met behulp van implanteerbare elektrodes en transmitters. Hierdoor wordt het aantal benodigde sedaties beperkt. De procedure voor het aanbrengen van de transmitter en de daaraan verbonden EEG elektrodes is eerder geoptimaliseerd, waardoor uitval van dieren door technische problemen on ongerief sterk verminderd zijn. 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. Voor het onderzoek naar de ziekte van Parkinson binnen het resus MPTP model zullen zowel mannetjes als vrouwtjes dieren worden gebruikt. Voor het onderzoek naar Parkinson dementie zullen bij voorkeur mannetjes apen worden gebruikt omdat cognitie bij niet humane primaten beïnvloed kan worden door oestrogenen en dat kan een effect hebben op de interindividuele variatie tussen en binnen de dieren. Daarom wordt het gebruik van vrouwtjes in het Parkinson dementie model terecht vermeden.

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. Bij de overige studies zullen de dieren 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 behandelmethodes tegen de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie in resus apen het ongerief dat deze dieren wordt aangedaan, de aantasting van de integriteit en het doden van de dieren? Is het gebruik van resus apen 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 behandelmethodes die verergering van de ziekte kunnen voorkomen of de symptomen kunnen verminderen. Tevens worden in deze aanvraag specifiek behandelmethodes tegen Parkinson dementie geëvalueerd en in geval van DBS geoptimaliseerd.

Parkinson dementie is een onderzoeksdomein waar pas recentelijk aandacht voor ontstaan is. Het tegengaan van dementie en van de motorische en andere klinische verschijnselen kan een sterke verbetering van de kwaliteit van leven van de betrokken personen en verlichting voor de sociale omgeving inhouden. 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). Daarmee is dit onderzoek van groot belang.

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 of Parkinson dementie en zullen hinder ondervinden door verminderd motorisch en cognitief functioneren. Tevens zullen de dieren operatieve ingrepen ondergaan, voor injectie van een neurotoxine in de basale kern van Meynert, het aanbrengen van elektrodes en het aanbrengen van een transmitter voor telemetrische data acquisitie. Operaties vinden plaats onder anaesthesie. Perioperatief wordt pijnstilling toegepast en worden antibiotica toegediend. De dieren kunnen enige pijn ondervinden door bloedafnames en injecties. Het ongerief zal matig zijn.

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 de bij Parkinson dementie optredende cognitieve achteruitgang tegen te gaan. In het projectvoorstel staat ook als voorwaarde aangegeven dat de te testen behandelmethode moet bijdragen aan het wetenschappelijk inzicht in de ziekte en dat kan onder meer bereikt worden door de PET studies. Deze kennis is van groot belang voor de verdere ontwikkeling van een gerichtere behandeling van de ziekte.

Indien de doelstellingen behaald worden, zal dit onderzoek bijdragen aan het verkrijgen van nieuwe behandelmethodes waarmee mensen met de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie behandeld kunnen worden. De nieuwe medicijnen dan wel de nieuwe DBS protocollen kunnen ofwel een alternatief vormen voor L-DOPA, waar ernstige bijwerkingen van bekend zijn, ofwel een betere behandeling geven van de niet-motorische verschijnselen van de ziekte van Parkinson, dan wel de geleidelijke achteruitgang in dementie tegengaan. 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 als geheel en die van de patiënten in het bijzonder, welke in dit project worden nagestreefd 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 of behandeling met DBS tegen de verschijnselen van de ziekte van Parkinson en of de daarmee gepaard gaande dementie 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 succesvol toegepast zijn door de onderzoeker in marmosets. Tevens

wordt samengewerkt met ervaren neurochirurgen. 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 behandelmethodes, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De studie zal worden uitgevoerd in resus apen (*Macaca mulatta*). De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor inductie van Parkinson met MPTP, de mogelijkheid om injecties uit te voeren en elektrodes te plaatsen in specifieke gebieden in het brein 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 van nieuwe behandelmethodes 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 het toepassen van telemetrie waardoor het aantal handelingen verminderd wordt, PET-CT om veranderingen in de hersenen over de tijd te kunnen volgen, zonder dat opofferen van het dier nodig is en training van dieren voor het meten van cognitie en andere gedragstesten. 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.

13

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre
10.2.e [redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020186345
Bijlagen
2

Datum 31 augustus 2018
Betreft Extra factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD5020020186345

Factuur
Factuurdatum: 5 november 2018
Vervaldatum: 6 december 2018
Factuurnummer: 18634501

Omschrijving	**Bedrag**
Extra betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5020020186345.	€ 516,00

Deze aanvraag was ingediend met 1 bijlage van 1285 euro. Nu we de aanvraag terug hebben gekregen van de DEC is het een aanvraag met 3 bijlagen geworden. De kosten voor een aanvraag met 3 bijlagen (€ 1791,-) zijn € 516,- hoger dan voor een aanvraag met 1 bijlage.

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.

10.2.e

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 19 november 2018 16:04
Aan: 10.2.e
10.2.e
Onderwerp: Vervolg aanvraag AVD5020020186345

10.2.e
Dank u voor het toesturen van de antwoorden op onze vragen en het toezenden van een aangepaste Niet technische samenvatting.
De CCD heeft uw aanvraag besproken in haar vergadering van 16 november jl. en is voornemens uw aanvraag te vergunnen op voorwaarde dat uw NTS nog op enkele punten wordt aangepast.

- Onder 3.4 van de NTS worden de gedragstesten niet genoemd. Graag deze hierbij noemen, zodat een volledig beeld ontstaat over welke handelingen de dieren ondergaan en bijbehorende gevolgen.
- Onder 4.3 beschrijft u dat de dieren getraind worden om "niet-belastende taken" uit te voeren. Hoewel wij niet denken dat dit incorrect is, is nooit met zekerheid te zeggen dat dit soort handelingen geen belasting zijn voor de dieren. We willen u vragen om dit aan te passen naar "taken waarvan niet verwacht wordt dat deze negatieve gevolgen hebben op het welzijn van de dieren" of iets dergelijks.

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.

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

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

Centrale Commissie Dierproeven

15

Advies aan CCD

B

Datum 20 november 2018

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20186345

Instelling:	Biomedical Primate Research Centre
Onderzoeker:	10.2.e
Project:	Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en parkinson dementie
Aanvraagnummer:	AVD20186345
Betreft:	Nieuwe aanvraag
Categorieën:	Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	Er is een aanvraag ingediend met 1 bijlage dierproeven. Naar aanleiding van vragen van de DEC is de aanvraag drastisch gewijzigd en zijn 2 bijlagen dierproeven toegevoegd. De aanvrager is nog de volgende vragen gesteld: - De NTS is op veel punten te moeilijk te volgen voor de leek. Zinnen/termen als: De motorische ziekte wordt geinduceerd met een toxische stof, een locale injectie met saporine, deep brain stimulatie, PK/PD sutide, telemetrische methoden zullen bij het brede publiek niet bekend zijn. Graag de NTS op meerdere punten aanpassen zodat deze beter leesbaar wordt voor het brede publiek. - In sectie 3.4 van de NTS wordt u gevraagd in te vullen wat de biotechnische handelingen zijn, en wat de gevolgen voor de dieren hiervan zijn. Ook de gevolgen van de ziekte moet beter worden beschreven. - In bijlage dierproeven 3.4.4.1 beschrijft u PK/PD studies. Kunt u in deze bijlage onder Vervanging aangeven of u alvorens deze middelen in vivo te testen gebruik heeft gemaakt van in silico modeling? Zo nee, waarom niet? - U beschrijft translationeel onderzoek. Daarbij beschrijft u het gebruik van alleen mannelijke dieren vanwege mogelijke effecten van oestrogenen op cognitie. In translationeel onderzoek kan het heel nuttig zijn om juist deze geslachtsverschillen mee te nemen in het onderzoek. Kunt u aanvullende onderbouwen waarom hier in dit geval niet voor gekozen is?

	- In bijlage 3.4.4.2 en 3.4.4.3 worden de gedragstesten algemeen omschreven. Het is voor de CCD onduidelijk a) welke gedragstesten er gebruikt worden, b) welke dieren/groepen de individuele gedragstest betreft en c) wat de frequentie en duur is van de testen. Verder dient specifiek omschreven te worden hoeveel testen een individueel dier maximaal ondergaat en hoe vaak en hoe lang een rustperiode aan de dieren wordt geboden tussen de tests. - De CCD vraagt zich ook af of in de cognitietesten gebruik gemaakt zal worden van voedsel- of waterdeprivatie. Indien dit het geval is dan dient u dit te beschrijven en te motiveren waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstelling.			
Naam proef	**Diersoort**	**Stam**	**Aantal dieren**	**Herkomst**
3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	volwassen M/V	16	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	volwassen, M/V	7	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**
3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	Volwassen M/V	48	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**

Bijlage 3.4.4.1: 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.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen. / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

- 3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel. / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat: Voor het onderzoek naar de motor symptomen in het MPTP model, kunnen beiden geslachten gebruikt worden. Voor het onderzoek naar Parkinson dementie wordt met voorkeur mannelijke apen gebruikt. Ondanks dat Parkinson dementia evenveel bij mannen als vrouwen voorkomt, is de cognitie gevoelig voor oestrogeen. Door alleen mannelijke dieren in te zetten willen we mogelijke uitkomstvariatie door de menstruatiecyclus minimaliseren [12].
- 3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat: Voor het onderzoek naar de motor symptomen in het MPTP model, kunnen beiden geslachten gebruikt worden. Voor het onderzoek naar Parkinson dementie wordt met voorkeur mannelijke apen gebruikt. Ondanks dat Parkinson dementia evenveel bij mannen als vrouwen voorkomt, is de cognitie gevoelig voor oestrogeen. Door alleen mannelijke dieren in te zetten willen we mogelijke uitkomstvariatie door de menstruatiecyclus minimaliseren [12].

Locatie uitvoering experimenten	10.2.g 10.2.g
Maatschappij	11.1

2 DEC advies

DEC-advies	Citaat C9: De keuze voor een niet humane primaten soort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor inductie van sterk op de ziekte van Parkinson gelijkende verschijnselen en het feit dat het model chronisch is, waardoor het effect van potentiele therapieën op specifieke ziekte symptomen en het verloop van de ziekte bestudeerd kunnen worden, dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld knaagdiermodellen. De specifieke keuze voor de resus aap in plaats van de marmoset betreft enerzijds het testen van therapieën die vanwege de grote specificiteit voor de mens hun aangrijpingspunt niet in de marmoset, maar wel in de resus aap herkennen (door de grotere evolutionaire verwantschap met de mens). Anderzijds betreft het behandelmethodes waarbij specifiek in bepaalde gebieden in de hersenen een injectie moet plaats vinden of elektrodes moeten worden geplaatst. De hersenen van de marmoset zijn te klein om dit nauwkeurig te kunnen doen, vandaar dat voorgesteld wordt dit onderzoek in de grotere resusaap uit te voeren. 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

te testen behandelmethodes 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.

Citaat 14: In dit project worden potentiele nieuwe therapieën tegen de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie geëvalueerd op hun werkzaamheid in resus 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 kunnen de cognitieve veranderingen die kenmerkend zijn voor Parkinson dementie worden gemodelleerd door injectie van ME20.4-saporine in de basale kern van Meynert. Modellen voor de ziekte van Parkinson in andere dieren (muis, kat en rat) zijn wel beschreven maar komen aanzienlijk minder goed overeen met de humane ziekte, zijn niet chronisch en ook de structuur van de hersenen en werking van geneesmiddelen is anders in andere diersoorten. Het marmoset MPTP model vertoont vele overeenkomsten met het resus MPTP model, maar is niet geschikt voor het testen van therapieën die niet kruisreageren met het doel-moleculen in de marmoset (maar wel in de resus aap) of wanneer specifiek bij de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie betrokken hersengebieden moeten worden geïnjecteerd of daar elektrodes in moeten worden aangebracht. Door de experimenten in resus apen 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 lijkt in dit stadium van de ontwikkeling van de potentiele therapieën dan ook niet verantwoord. DBS wordt reeds bij mensen toegepast voor de behandeling van motorische symptomen van de ziekte van Parkinson. Echter voor toepassing van DBS voor behandeling van cognitieve symptomen bij de mens is momenteel onvoldoende kennis aanwezig. Onderzoek in resus apen is nodig om het benodigde stimulatie algoritme en het mogelijk therapeutisch effect te bepalen. Toepassing van DBS zonder deze kennis kan leiden tot tegenovergestelde en dus schadelijke effecten en dit kan daarom niet direct in de mens onderzocht worden.

Citaat C18: Voor het onderzoek naar de ziekte van Parkinson binnen het resus MPTP model zullen zowel mannetjes als vrouwtjes dieren worden gebruikt. Voor het onderzoek naar Parkinson dementie zullen bij voorkeur mannetjes apen worden gebruikt omdat cognitie bij niet humane primaten beïnvloed kan worden door oestrogenen en dat kan een effect hebben op de interindividuele variatie tussen en binnen de dieren. Daarom wordt het gebruik van vrouwtjes in het Parkinson dementie model terecht vermeden.

Citaat C20: Hergebruik zal plaats vinden binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke kwaliteit.

Ethische afweging van de DEC:
Citaat:
1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het evalueren van nieuwe potentiele behandelmethodes tegen de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie in resus apen het ongerief dat deze dieren wordt aangedaan, de aantasting van de integriteit en het doden van de dieren? Is het gebruik van resus apen in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen.

2. De waarde voor de te behandelen personen met de ziekte van Parkinson is gelegen in het mogelijk beschikbaar komen van effectieve behandelmethodes die verergering van de ziekte kunnen voorkomen of de symptomen kunnen verminderen. Tevens worden in deze aanvraag specifiek behandelmethodes tegen Parkinson dementie geëvalueerd en in geval van DBS geoptimaliseerd. Parkinson dementie is een onderzoeksdomein waar pas recentelijk aandacht voor ontstaan is. Het tegengaan van dementie en van de motorische en andere klinische verschijnselen kan een sterke verbetering van de kwaliteit van leven van de betrokken personen en verlichting voor de sociale omgeving inhouden. 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). Daarmee is dit onderzoek van groot belang.

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 of Parkinson dementie en zullen hinder ondervinden door verminderd motorisch en cognitief functioneren. Tevens zullen de dieren operatieve ingrepen ondergaan, voor injectie van een neurotoxine in de basale kern van Meynert, het aanbrengen van elektrodes en het aanbrengen van een transmitter voor telemetrische data acquisitie. Operaties vinden plaats onder anaesthesie. Perioperatief wordt pijnstilling toegepast en worden

antibiotica toegediend. De dieren kunnen enige pijn ondervinden door bloedafnames en injecties. Het ongerief zal matig zijn.

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 de bij Parkinson dementie optredende cognitieve achteruitgang tegen te gaan. In het projectvoorstel staat ook als voorwaarde aangegeven dat de te testen behandelmethode moet bijdragen aan het wetenschappelijk inzicht in de ziekte en dat kan onder meer bereikt worden door de PET studies. Deze kennis is van groot belang voor de verdere ontwikkeling van een gerichtere behandeling van de ziekte.

Indien de doelstellingen behaald worden, zal dit onderzoek bijdragen aan het verkrijgen van nieuwe behandelmethodes waarmee mensen met de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie behandeld kunnen worden. De nieuwe medicijnen dan wel de nieuwe DBS protocollen kunnen ofwel een alternatief vormen voor L-DOPA, waar ernstige bijwerkingen van bekend zijn, ofwel een betere behandeling geven van de niet-motorische verschijnselen van de ziekte van Parkinson, dan wel de geleidelijke achteruitgang in dementie tegengaan. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

3. De DEC concludeert dat de belangen van de samenleving als geheel en die van de patiënten in het bijzonder, welke in dit project worden nagestreefd 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 of behandeling met DBS tegen de verschijnselen van de ziekte van Parkinson en of de daarmee gepaard gaande dementie 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 succesvol toegepast zijn door de onderzoeker in marmosets. Tevens wordt samengewerkt met ervaren neurochirurgen. 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 behandelmethodes, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De studie zal worden uitgevoerd in resus apen

(Macaca mulatta). De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor inductie van Parkinson met MPTP, de mogelijkheid om injecties uit te voeren en elektrodes te plaatsen in specifieke gebieden in het brein 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 van nieuwe behandelmethodes 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 het toepassen van telemetrie waardoor het aantal handelingen verminderd wordt, PET-CT om veranderingen in de hersenen over de tijd te kunnen volgen, zonder dat opofferen van het dier nodig is en training van dieren voor het meten van cognitie en andere gedragstesten. 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
De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over:
Aanvullende argumentatie omtrent de noodzaak om resus apen te gebruiken voor onderzoek naar het therapeutisch effect van DBS op de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie, criteria waaraan kandidaat geneesmiddelen moeten voldoen om in aanmerking te komen voor evaluatie in dit diermodel en of er geen PK/PD studies nodig zou zijn om de juiste dosering en het toedieningsschema te bepalen, aanvullende informatie betreffende proefopzet, de opzet van het in het projectvoorstel vermelde pilot-experiment, de biotechnische handelingen en gedragstesten, de keuze om mannetjes te gebruiken voor onderzoek naar Parkinson dementie en het ongerief.

Citaat: In de tweede vragenronde werd de onderzoeker geïnformeerd dat naar de mening van de DEC DBS voor behandeling van motorische symptomen bij de ziekte van Parkinson reeds uitgebreid bij mensen wordt toegepast en dus niet nader onderzocht hoeft te worden. De DEC was echter wel overtuigd, mede door de door de onderzoeker aangereikte argumenten, van het belang van nader onderzoek in resus apen voor behandeling van Parkinson dementie d.m.v. DBS. Verder werd gevraagd om een nadere omschrijving van de te volgen strategie bij de

	haalbaarheidsstudie (de nieuwe bijlage 2), de geschiktheid van de beschreven gedragstest om cognitieve verstoringen bij Parkinson dementie te meten, nadere uitleg omtrent het aantal proefgroepen bij de therapie evaluatie studies (de nieuwe bijlage 3) en om enkele tekstuele aanpassingen. Op 29-10-2018 werd gevraagd om nadere uitleg over het gebruikte MPTP inductie model. Het projectvoorstel is ingrijpend gewijzigd naar aanleiding van de vragen van de DEC. Het DEC advies is Positief Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
11.1 [redacted]	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	Citaat: De ziekte van Parkinson is een ernstig invaliderende ziekte bij de mens waarvoor op dit moment slechts beperkte behandelingen beschikbaar zijn. Deze behandelingen bestrijden alleen de motorische symptomen en vertonen na verloop van tijd ernstige bijwerkingen. In dit project wordt daarom de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes tegen verschillende aspecten van de ziekte van Parkinson onderzocht in het resusaap Parkinsonmodel. Dit betreft de motorische symptomen, en Parkinson dementie waarbij in Parkinson patienten de cognitie is verstoord. [...] Er is een grote behoefte aan nieuwe farmacologische en niet-farmacologische behandelingen zoals medicijnen tegen PD en deep brain stimulatie als behandeling bij PDD. De resultaten van deze studies worden gebruikt voor selectie van kandidaat geneesmiddelen of voor de optimalisatie van behandelmethodes voor verdere klinische studies. Een potentieel nieuwe behandeling wordt alleen onderzocht in het aapmodel als in andere diermodellen geen ernstige bijwerkingen naar voren gekomen zijn en er aanwijzingen zijn dat de behandeling effectief kan zijn tegen de ziekte van Parkinson. Het concrete doel van dit project is selectie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson en bijkomende aspecten zoals dementie voor verdere klinische studies. Het is de verwachting dat binnen de looptijd van dit project 3 nieuwe methoden onderzocht gaan worden. Het uiteindelijke doel van het onderzoek is dat behandelmethodes 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: Alleen al 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 ouderdomsziekte 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 alleen de motorische 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 en bijwerkingen voor het medicijn en moet de patiënt tussendoor regelmatig overstappen op andere medicijnen. 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 resusaap Parkinsonmodel 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 de behandeling worden ontdekt. Deze informatie is van belang voor het verdere traject van de behandelmethode voor klinisch gebruik. Verder is het onderzoek in de resusaap ook van belang voor het optimaliseren van DBS therapiëen. Dit geldt met name voor het behandelen van de cognitieve achteruitgang bij de ziekte van Parkinson (PDD). Ondanks eerdere positieve preklinische studies, blijkt er geen eenduidig effect op te treden binnen klinische trials/studies. Dit komt door een beperkte preklinische basis voor de translatie naar de kliniek [5]. De dierstudies zijn allen uitgevoerd met gezonde dieren zonder schade aan de NBM. Geen enkele studie heeft de relatie tussen de mate van cholinerge activatie na stimulatie van de NBM en de cognitieve verbetering laten zien. Tevens is er ook niet gekeken naar het stimulatie algoritme van de DBS in relatie tot het beoogde effect. Terwijl er aanwijzingen zijn dat het stimulatie patroon van groot belang is voor het effect. Een verkeerd gekozen stimulatie kan zelfs tot tegenovergestelde schadelijke effecten leiden. Daarom is het nodig om een stap terug te doen naar een preklinische studie om te onderzoeken wat het effect van verschillende stimulatie protocollen is. Dit kan niet in de mens omdat een verkeerd gekozen stimulatie een schadelijke uitwerking kan hebben. Bovendien, zal met het diermodel ook de ernst van de schade (vroege of late fase van de ziekte) in relatie tot het effect van de behandeling worden uitgezocht. Hierdoor kunnen in de toekomst patiënten geselecteert worden voor deze behandeling. Er is op dit moment geen inzicht in de relatie van slaagkans van NBM-DBS in relatie tot de ernst van het klinische beeld.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1

Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	Citaat uit DEC advies: 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. De onderzoeker heeft een grote expertise op het gebied van de ziekte van Parkinson en jarenlange ervaring met onderzoek naar deze ziekte en het evalueren van nieuwe therapieën in het marmoset MPTP model, inclusief het toepassen van geavanceerde uitleessystemen voor neurologische aandoeningen. Alhoewel er binnen het instituut nog niet eerder gewerkt is met het resus MPTP model is er veel ervaring met het gebruik van resus apen in biomedisch onderzoek en is dit model internationaal een veel toegepast en goed gevalideerd model. Dit onderzoek wordt uitgevoerd in samenwerking met ervaren neurochirurgen. 11.1 [redacted]

3V's

Vervanging	
	3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.: Citaat: In veel gevallen wordt een teststof door een externe partij aangeleverd om te testen in het resusaap Parkinson-model. Een therapie kan meteen in het resusaap Parkinson-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 resusaap. Echter wanneer dit niet voldoende informatie oplevert voor een therapie evaluatie in het Parkinson-model, dient er voorafgaand aan een therapie evaluatie (Bijlage 3) eerst een farmacokinetiek en/of dosisbepaling op relevante gedrags biomerkers in de gezonde resusaap gedaan te worden. Op dit moment zijn er geen in vitro modellen (zoals cellijnen, organoïds) beschikbaar voor het resusaap model om de opname, bio-beschikbaarheid etc. van de nieuwe middelen te onderzoeken.

	3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: Citaat: Deze haalbaarheidsstudie is bedoeld voor het optimaliseren en valideren van het MPTP model voor PD en van het saporine model voor PDD in de resusaap (bijlage 3). Daarom vervalt hier het mogelijk gebruik van in vitro methodes of onderzoek in knaagdieren. Het gebruik van het resusaapmodel bij Parkinson-onderzoek is veel toegepast en uitgebreid gevalideerd. Het gebruik van apen bij PD/PDD-onderzoek dient vooral als een preklinische evaluatie van nieuwe therapieën voordat klinische trials in patiënten worden gestart. Aangezien de resusaap een grote aapsoort is, is de resusaap geschikt voor het plaatsen van DBS-elektroden en het aanbrengen van lokale laesies in specifieke kleine hersenkernen.
	3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: 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 functieverlies. 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. Doordat de klinisch relevante Parkinson-symptomen niet spontaan verdwijnen in de aap-modellen voor de ziekte van Parkinson, is de aap 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. Als aap model wordt de marmosetaap, de cynomolgusaap en de resusaap gebruikt binnen dit onderzoeksveld. Het gebruik van het resusaapmodel bij Parkinson-onderzoek is veel toegepast en uitgebreid gevalideerd. Het gebruik van apen bij PD/PDD-onderzoek dient vooral als een preklinische evaluatie van nieuwe therapieën voordat klinische trials in patiënten worden gestart. Aangezien de resusaap een grotere aapsoort is dan de marmosetaap, is de resusaap geschikter voor het plaatsen van

	DBS-elektroden en het aanbrengen van lokale laesies in specifieke kleine hersenkernen. Een soortgelijke studie met DBS in de NBM is eerder toegepast in de resusaap echter in gezonde apen zonder dat dementie-verschijnselen waren geïnduceerd [14]. Onderzoek naar een nieuwe behandeling voor PDD in het resusaapmodel zal de translationele waarde van een therapie verhogen voordat deze wordt toegepast bij Parkinson-patiënten lijdend aan dementie. Dit kan nog niet direct in de mens worden toegepast omdat het optimale frequentiepatroon van de stimulatie nog niet bekend is. Ook is nog niet bekend wat de neveneffecten van verschillende stimulatie algoritmen zijn op de hersenen. Tot nu toe wordt alleen een continue stimulatie met lage frequentie (20-50 Hz) aangeboden. Deze vorm van stimulatie heeft waarschijnlijk een negatief effect [14] waardoor er ook geen eenduidige resultaten gevonden worden. Een klinische trial met 6 patiënten is om deze reden mislukt [15]. Daarom is het nodig om een stap terug te doen naar een preklinische studie om te onderzoeken wat het effect van verschillende stimulatie protocollen is. Dit kan niet in de mens omdat een verkeerd gekozen stimulatie een schadelijke uitwerking kan hebben. Bovendien, zal met het diermodel ook de ernst van de schade (vroege of late fase van de ziekte) in relatie tot het effect van de behandeling worden uitgezocht.
Verminderen	
	3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.: Citaat: Een farmacokinetiek of een dosis bepaling op relevante gedrags biomerkers zal worden gedaan met het minimumaantal dieren dat nodig is. In het algemeen kan zo’n studie met vier dieren volstaan. Het leidt vooral tot vermindering van het aantal dieren in de daaropvolgende Parkinson-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. Waar mogelijk kunnen verschillende doseringen van een teststof in hetzelfde dier worden getest waardoor het aantal dieren minder zal zijn.

	3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: Citaat: Voordat deze Parkinson modellen worden ingezet in studies is het van belang dat de haalbaarheid is onderzocht. Pas bij een positief resultaat (het kunnen induceren van de ziekte van Parkinson of de cognitieve achteruitgang zoals bij de ziekte van Parkinson optreedt), kan een studie worden gestart. Voor de haalbaarheid wordt het uiterst minimaal aantal dieren van n=3 bij het MPTP model en n=4 bij het saporine model, gebruikt. In de feasibility studie van het saporine model wordt eerst met een dier het effect van oplopende doseringen saporine op het effect van acetylcholine afgifte getest. Hierdoor kan daarna preciezer de dosis saporine in de volgende stap met n=3 dieren worden vastgesteld. Door een longitudinale studie over meerdere weken toe te passen waarbij dieren gedurende een langere periode worden gevolgd met behulp van gedragsobservatie en neuroimaging kan het aantal dieren worden beperkt. Het gebruik van in vivo PET-CT-scan zal informatie opleveren over veranderingen in acetylcholine producerende cellen en hun receptoren over de tijd binnen dezelfde dieren. Dit bespaart veel dieren in vergelijking met een conventionele postmortem studie waarbij voor hetzelfde resultaat meer dieren zijn vereist. De gedrags- en PET-CT-scan veranderingen na ziekte inductie worden met de eigen oorspronkelijke performance (nulwaarden) vergeleken. Bovendien leidt het uitvoeren van meerdere verschillende testen in hetzelfde dier tot vermindering van het aantal proefdieren.

	3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: Citaat: Voordat een geneesmiddel 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. Een behandeling wordt daarna verder in de aap onderzocht om de vertaalslag naar de mens te vergroten. Door een longitudinale studie toe te passen waarbij dieren gedurende een langere periode worden gevolgd met behulp van gedrags- en neuroimagingobservatie kan het aantal dieren worden beperkt. Het gebruik van in vivo PET-CT-scan zal informatie opleveren over veranderingen in dopamine en acetylcholine producerende cellen en hun receptoren over de tijd binnen dezelfde dieren. Dit bespaart veel dieren in vergelijking met een conventionele postmortem observatie waarbij voor hetzelfde resultaat meer dieren zijn vereist. Het aantal benodigde dieren wordt per experiment bepaald aan de hand van power-analyse. Het minimaal aantal benodigde dieren zal worden gebruikt. Om het aantal dieren te verminderen wordt voor de selectie van de dieren van tevoren het gedrag van elk dier gemeten, zodat de groepen gelijke basiswaarden vertonen. De gedrags- en PET-CT-scan veranderingen na ziekteinductie en na behandeling worden daarna met de eigen oorspronkelijke performance (nulwaarden) vergeleken. Bovendien leidt het uitvoeren van meerdere verschillende testen in hetzelfde dier tot vermindering van het aantal proefdieren.
Verfijnen	
	3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.: Citaat: De dieren worden getraind om zo veel mogelijk vrijwillig mee te werken aan de experimentele handelingen zoals het geven van een verdoving of teststof toedieningen. De dieren worden altijd sociaal gehouden in een voor de resusaap geschikte, verrijkte omgeving Citaat: 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 wordt sedatie waar mogelijk vermeden.

	3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: Citaat: Voor de resusaap zijn diverse meetsystemen voorhanden om gedragsfuncties te kwantificeren. Deze functies kunnen op een standaard manier worden gemonitord zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Deze metingen kunnen plaatsvinden in de thuiskooi. Een voorbeeld is de 24-uurs activiteit middels een actimeter. Een ander voorbeeld is het meten van de hersenactiviteit (EEG) waarbij een implanteerbare transmitter voor draadloze metingen wordt gebruikt waardoor de aap vrij kan bewegen. De procedure voor het aanbrengen van EEG-elektrodes is in eerdere studies verfijnd, waardoor de uitval van dieren door technische problemen sterk verminderd is [12]. Het gebruik van de PET-CT-scan maakt het mogelijk om veranderingen in de hersenen over de tijd binnen het afzonderlijke dier te kunnen volgen. Hiervoor moest voorheen een dier geëuthanaseerd worden om dit post-mortem histologisch te kunnen meten. Voor het meten van de cognitie worden de apen eerst 'gehabitueerd' aan de opstelling en daarna stapsgewijs voor de taak getraind. Doordat verschillende parameters in hetzelfde dier worden getest, is een nauwkeurigere meting van het effect van een behandeling mogelijk. Dit lijdt tot verfijning en draagt tevens bij tot een nauwkeuriger bepaling van humane eindpunten. Citaat: De dieren worden voor aanvang van de studie getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan biotechnische handelingen zoals het toedienen van een injectie. 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 cognitietaak). Citaat: De operaties vinden plaats onder algehele anesthesie. Na een operatie wordt een postoperatieve herstelperiode van minstens twee weken toegepast. Na een intracraniale injectie wordt na twee weken met behulp van een PET-CT-scan de effectiviteit van de ingreep gecheckt. Analgesie zal pre- en postoperatief worden gegeven. Bovendien zal lokale anesthetica worden toegediend op de plaats van de chirurgische incisie. Als er tijdens dagelijkse algemene observaties tekenen van pijn, ontsteking of infectie zijn, zullen er pijnstillers en/of antibiotica worden gegeven. PET-CT-scan meting vindt plaats onder algehele anesthesie. Citaat: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente dierverzorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag dan wordt de veterinair hiervan op de hoogte gesteld om te beoordelen of ingrijpen nodig is om ongerief tot een minimum te beperken.

	3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: Citaat: Voor de resusaap zijn diverse meetsystemen voorhanden om gedragsfuncties te kwantificeren. Deze functies kunnen op een standaard manier worden gemonitord zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Deze metingen kunnen plaatsvinden in de thuiskooi. Een voorbeeld is de 24-uurs activiteit en de lichaamstemperatuur middels een implanteerbare transmitter. Een ander voorbeeld is het meten van de hersenactiviteit (EEG), voor het meten van bijvoorbeeld slaap, waarbij eveneens een implanteerbare transmitter voor draadloze metingen wordt gebruikt waardoor de aap vrij kan bewegen. Voor zowel de temperatuur, activiteit als het EEG kan dezelfde transmitter worden gebruikt. De procedure voor het aanbrengen van EEG-elektrodes is in eerdere studies verfijnd, waardoor de uitval van dieren door technische problemen sterk verminderd is [16]. Het gebruik van de PET-CT-scan maakt het mogelijk om veranderingen in de hersenen over de tijd binnen het afzonderlijke dier te kunnen volgen. Hiervoor moest voorheen een dier geëuthaniseerd worden om dit post-mortem histologisch te kunnen meten. Voor het meten van de cognitie worden de apen eerst 'gehabitueerd' aan de opstelling en daarna stapsgewijs voor de taak getraind. Doordat verschillende parameters in hetzelfde dier worden getest, is een nauwkeurigere meting van het effect van een behandeling mogelijk. Dit lijdt tot verfijning en draagt tevens bij tot een nauwkeuriger bepaling van humane eindpunten. Citaat: De dieren worden voor aanvang van de studie getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan invasieve biotechnische handelingen zoals het toedienen van een injectie of het afnemen van bloed. 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 cognitietaak). Citaat: De operaties vinden plaats onder algehele anesthesie. Na een operatie wordt een postoperatieve herstelperiode van minstens twee weken toegepast. Na een intracraniale injectie wordt na twee weken met behulp van een PET-CT-scan de effectiviteit van de ingreep gecheckt. Analgesie zal pre- en postoperatief worden gegeven. Bovendien zal lokale anesthetica worden toegediend op de plaats van de chirurgische incisie. Als er tijdens observaties tekenen van pijn, ontsteking of infectie zijn, zullen er pijnstillers en/of antibiotica worden gegeven. PET-CT-scan meting vindt plaats onder algehele anesthesie. Citaat: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente dierverzorgers. Mochten er

	veranderingen optreden in gedrag dan wordt de veterinair hiervan op de hoogte gesteld om te beoordelen of ingrijpen nodig is om ongerief tot een minimum te beperken.
3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.: 11.1	
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: 11.1	
3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: 11.1	
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde 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.	
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: Citaat: Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaatsvinden 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.	
3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: Zie bijlage 3.4.4.2.	

Naam proef	**Worden de dieren gedood?**	**Doden volgens richtlijn?**
3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		

3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.	HEP: <1%	Citaat: 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.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.	HEP: <5%	Citaat: 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 achtereenvolgende 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 (interesse in de omgeving), immobiliteit, alertheid, tremoractiviteit. Deze symptomen worden gescoord op een schaal van 0 (niet waargenomen), 1 (waargenomen maar onderdeel van normaal gedrag), 2 (waargenomen in een lichte vorm), 3 (duidelijk waargenomen), en 4 (waargenomen in een ernstige vorm).
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	

3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel	HEP: <5 %	Citaat: 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 achtereenvolgende 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 (interesse in de omgeving), immobiliteit, alertheid, tremoractiviteit. Deze symptomen worden gescoord op een schaal van 0 (niet waargenomen), 1 (waargenomen maar onderdeel van normaal gedrag), 2 (waargenomen in een lichte vorm), 3 (duidelijk waargenomen), en 4 (waargenomen in een ernstige vorm).
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

11.1

11.1 [redacted]

11.1 [redacted]

In dit project worden dieren gebruikt die mogelijk gebruikt zijn in eerdere studies, en dieren uit bijlage 3.4.4.1 zullen later mogelijk worden hergebruikt in andere studies. Hergebruik zal plaatsvinden binnen de wettelijke kaders.

11.1 [redacted]

11.1 [redacted]

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

11.1 [redacted]

11.1 [redacted]

11.1 [redacted]

11.1 [redacted]

[redacted]

11.1 [redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

16

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Biomedical Primate Research Centre
10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020186345
Bijlagen
1

Datum 21 november 2018
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

10.2.e

Op 30 augustus 2018 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en parkinson dementie" met aanvraagnummer AVD5020020186345. 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 20 november 2018 tot en met 1 september 2023.
De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie
Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie (DEC) 10.2.g Dit advies is ontvangen op 1 november 2018. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Nadere vragen aanvrager
Op 12 november 2018 en 19 november 2018 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op een aangepaste NTS die beter voor de leek te begrijpen is en de handelingen aan de dieren beter weergeeft, de mogelijkheid voor gebruik in silico methoden, een nadere uitleg van de uit te voeren gedragstesten en of hierbij voer- of waterdeprivatie wordt toegepast. 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 augustus 2024 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 93118, 2509 AC 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:
21 november 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020186345

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2.g [redacted]

drs. F. Braunstahl
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 20 november 2018 tot en met 1 september 2023, voor het project "Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en parkinson dementie" met aanvraagnummer AVD5020020186345, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Wetenschappelijk medewerker, neu robioloog. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is Afdelingshoofd verantwoordelijk.
Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 30 augustus 2018
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
   a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 1 november 2018;
   b Bijlagen dierproeven
      - 3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen., zoals ontvangen op 1 november 2018;
      - 3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel., zoals ontvangen op 1 november 2018;
      - 3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel, zoals ontvangen op 1 november 2018;
   c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 19 november 2018;
   d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 1 november 2018
   e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 13 november 2018, 19 november 2018.

Naam proef	**Diersoort/ Stam**	**Aantal dieren**	**Ernst**
3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.			
	Rhesusapen (Macaca mulatta) / volwassen M/V	16	100,0% Matig
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.			
	Rhesusapen (Macaca mulatta) / volwassen, M/V	7	100,0% Matig
3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel			
	Rhesusapen (Macaca mulatta) / Volwassen M/V	48	100,0% Matig

Aanvraagnummer:
AVD5020020186345

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 augustus 2024 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:
AVD5020020186345

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.

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

Aanvraagnummer:
AVD5020020186345

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 NTS20186346	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	NTS origineel			x					
3	projectvoorstel				x			x	
4	Bijlage dierproeven 1			x					
5	Bijlage dierproeven 2			x					
6	bijlage dierproeven 3			x					
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	aanhouden beoordelen brief				x		x		
9	aanvullende informatie				x		x		
10	aanvraagformulier herzien				x		x	x	
11	projectvoorstel herzien				x			x	
12	Bijlage dierproeven 1 herzien			x					
13	Bijlage dierproeven 2 herzien			x					
14	bijlage dierproeve 3 herzien			x					
15	NTS definitief	x							
16	DEC advies				x		x	x	
17	Advies CCD				x		x		x
18	Beschikking en vergunning				x		x	x	

3 1 AUG 2018

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 X Dhr. ☐ Mw.
		Functie	10.2.g
		Afdeling	
		Telefoonnummer	10.2.g
		E-mailadres	
1.5	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

1.6	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.7	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	X Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*	
		☐ 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
		X Nee > Ga verder met vraag 3
2.3	Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	X 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 - 11 - 2018
		Einddatum	31 - 10 - 2023
3.2	Wat is de titel van het project?	Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Malaria infectie van apen om parasieten te verkrijgen voor studies die geneesmiddelen- en vaccin ontwikkeling ondersteunen	
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	10.2.g
		E-mailadres	10.2.g

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☐ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1791 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

☐

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	30 - 08 - 2018
Handtekening	10.2.g

2

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	Bestudering van ziektemechanismen en de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes in niet-menselijke primaten modellen van humane malaria infecties
1.2 Looptijd van het project	1 november 2018—31 oktober 2023
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	malaria, parasiet-gastheer interacties, vaccin, geneesmiddel

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project. *U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*	☒ Fundamenteel onderzoek
	☒ 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	Malaria is een van de belangrijkste infectieziekten ter wereld, met desastreuze invloed op de sociale en economische ontwikkeling van de betreffende gebieden. De ziekte veroorzaakt wereldwijd tot 660.000 doden per jaar en vele miljoenen worden ziek. Er bestaan geen effectieve vaccins en malariaparasieten worden in hoog tempo resistent tegen geneesmiddelen. Een vaccin zou de oplossing zijn, maar ondanks meer dan 75 jaar onderzoek is er nog geen goed vaccin beschikbaar. Het onderzoek naar malariavaccins wordt gehinderd door gebrek aan 1) begrip van de immuniteit tegen malaria, 2)

	maatschappelijke belang)	kennis van de moleculaire interactie tussen parasiet en immuunsysteem van de patiënt en 3) biomerkers van bescherming en verschillen in ziekteverloop. De grote verschillen tussen mensen onderling en tussen de verschillende malariaparasieten maakt het bijna onmogelijk om parasiet-gastheer interacties tot in detail te bestuderen bij patiënten. Het gebruik van apen maakt het mogelijk om de wisselwerking tussen genetische achtergrond, immuunreactie en ziekmakende eigenschappen van de parasiet wel te onderzoeken. Het doel is dan ook om biomerkers te vinden die de gevoeligheid voor malaria voorspellen, om nieuwe middelen te ontwikkelen, en de afweer tegen malaria beter te begrijpen. Waar nodig zal de juiste dosering van een behandeling eerst worden getest in een gecombineerde farmacokinetiek/ farmacodynamiek (PK/PD) studie. Combinaties van vaccinatie strategieën en middelen gericht op de afweer van de patiënt worden ook onderzocht.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Inzicht in werkzaamheid van nieuwe anti-malaria middelen, verbeterde inzichten in de afweer tegen malaria, verbeterde kennis van de malaria-gastheer interacties. Identificatie van biomerkers van bescherming en ziekteverloop, welke kunnen worden gebruikt om het klinische en epidemiologische malaria onderzoek te sturen.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	In 5 jaar tijd zullen maximaal 100 resusapen, 40 Java apen en 48 marmosets nodig zijn.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Handelingen veroorzaken stress. Dit wordt zoveel mogelijk beperkt door dieren te trainen voor eenvoudige handelingen. Voor complexere handelingen worden dieren verdoofd. Dieren worden mogelijk ziek door malaria besmetting.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Het ongerief is maximaal matig, in de meeste gevallen (50%) licht.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Een deel van de dieren (~20%) wordt genezen van malaria en blijft deel uitmaken van het dierbestand op het instituut en is beschikbaar voor hergebruik; overige: euthanasie om weefsels en organen te onderzoeken.

4 Drie V's

4.1	**Vervanging** Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije	Klinische studies zijn tijdrovend en kostbaar, en er is slechts beperkte capaciteit. Experimentele infecties in naïeve vrijwilligers zijn beperkt om ethische redenen. Malaria pathogenese en afweer zijn dermate complex dat (bij de huidige stand van wetenschap) een diervrij *in vitro* alternatief niet

	alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	voorhanden is. Aaponderzoek zal alleen worden ingezet als kleinere proefdieren onbruikbaar zijn of onvolledig inzicht geven.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Door literatuuronderzoek, internationale samenwerking, preselectie van alleen de meest veelbelovende kandidaat-vaccins/therapieën, berekening van het aantal benodigde dieren per groep op basis van eerdere resultaten uit soortgelijke experimenten en statistische methodes, waar mogelijk combinatie van doel-/vraagstellingen met gedeeld gebruik van controlegroepen, selectie per experiment van dieren met een homogene achtergrond.
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.	Het onderzoek gebeurt in apen, omdat de gastheer-parasietcombinaties in apen uitstekende modellen vormen voor de menselijke malariavarianten. Door langdurige ervaring met deze diermodellen zijn de protocollen verfijnd om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden. Het ongerief wordt beperkt door dieren te trainen voor eenvoudige handelingen. De klinische malariaverschijnselen in apen zijn gering; de dieren worden vroegtijdig genezen of geëuthanaseerd volgens humane eindpunten afhankelijk van de vraagstelling van de studie. De gezondheidstoestand van de dieren wordt nauwkeurig geobserveerd.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Complexere handelingen worden uitgevoerd onder verdoving. Het gebruik van getrainde dieren voor eenvoudige handelingen vermindert de stress. Tijdens de infectie worden de dieren geobserveerd. Als ziekteverschijnselen optreden worden de dieren genezen of geëuthanaseerd volgens humane eindpunten.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	
Andere opmerkingen	

[redacted]

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.	Study of parasite host-interactions and efficacy of new treatment methods in non-human primate malaria models relevant to human malaria infection.

2 Categories

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

- ☒ Basic research
- ☒ Translational or applied research
- ☐ Regulatory use or routine production
- ☐ Research into environmental protection in the interest of human or
- ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- ☐ Higher education or training
- ☐ Forensic enquiries
- ☐ Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Malaria is one of the most important human infectious diseases, affecting particularly the poorest populations living in the tropical and the sub-tropical areas of the world. Malaria is a serious disease, deaths

are a consequence of a series of complications termed severe malaria and of treatment failure. The high mortality combined with an even higher burden of disease, known as morbidity, is hampering the socio-economic development of developing countries. Yearly around 660,000 people die of malaria, the majority of which are children younger than 5 years of age, pregnant women, the elderly and immunocompromised adults. Overall 3,2 billion people in 95 countries are at risk of malaria infection. A vaccine able to provide sterile protection from infection does not exist and the parasite is becoming resistant to drugs very quickly leading to an increasing level of treatment failure. Given the seriousness of the threat that malaria poses, effective vaccines and drugs are urgently needed (1).

Malaria is caused by parasites of the genus *Plasmodium*, which are transmitted to their vertebrate host through *Anopheles* mosquitoes. After a mosquito bite the parasite stages known as sporozoites travel first to the liver where they multiply for six to ten days (figure 1). The liver phase of the infection is asymptomatic. When the infected liver cells burst, around 10.000-40.000 new parasites are released into the blood stream, which infect red blood cells and can multiply up to ± 10-fold. Some malaria parasite species, aside from producing developing liver stages, give also rise to sleeping liver stages, which do not develop in a first instance, but stay quiescent in the liver for a variable amount of time before reactivation. Such liver forms are known as hypnozoites. The blood stage of the malaria infection is responsible for the symptoms of disease. During this phase of infection also sexual blood stages (gametocytes) of the parasite are formed, which are ingested by the mosquito with the following blood meal. In the mosquito, female and male gametocytes combine to form the zygote (the fertile parasite stage), which gives rise to a new generation of sporozoites that travel to the salivary glands of the mosquito from where they are transmitted again to a vertebrate host during the next blood meal thus perpetuating the cycle of transmission and disease.

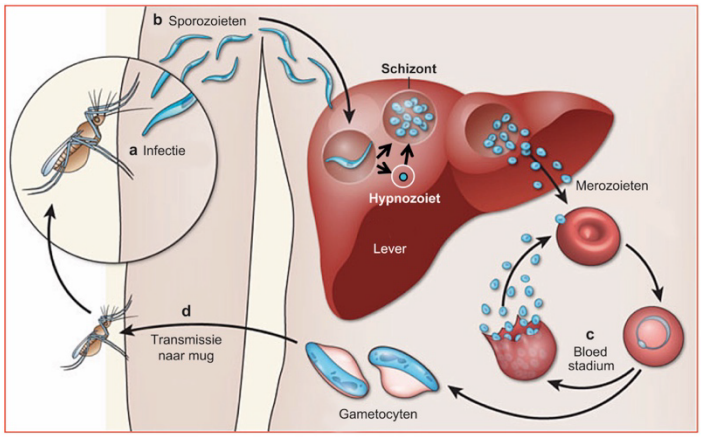

Figure 1. The life cycle of the malaria parasite. Sporozoites are transmitted from a mosquito to a vertebrate host and travel to the liver. Hypnozoites in the liver are only formed by *P. vivax*, *P. ovale* (human malarias), and a limited number of non-human primate malaria parasites. Merozoites leave the liver to enter the blood stream and infect red blood cells, in which they multiply at every cycle. In the blood they also form sexual stages (gametocytes), that are transmitted from the host to the mosquito during the next blood meal, thus perpetuating the cycle of transmission and infection

There are five *Plasmodium* species that infect humans: *P. falciparum*, *P. vivax, P. malariae, P. ovale and P. knowlesi*. Of these species *P. falciparum* and *P. vivax* are the most widespread. *P. falciparum* is responsible for the high malaria mortality, while *P. vivax* is responsible for the high malaria burden of disease (morbidity) as it gives rise to a more chronic form of malaria brought about by the re-activation of hypnozoites. Two human parasites (*P. vivax, P. ovale*) are able to form hypnozoites, which can reactivate weeks, months or even years after the primary infection giving rise to malaria anew, without exposure to a new infection. On the other hand, *P. falciparum*, *P. malariae* and *P. knowlesi* infections in humans do not give rise to sleeping liver stages but can be responsible for extremely serious complications leading to death.

Individuals have been found to be differentially susceptible to the infection (2), which is thought to cause the heterogeneity in disease presentation ranging from asymptomatic to mild, from chronic to severe. This heterogeneity is a hallmark of malaria and is likely caused by the interplay between genetic background of both host and parasite (including differences between parasite strains), host immune response and parasite virulence. An in-depth understanding of this interplay is key to improving our knowledge of the aetiology and mechanisms of disease, which in turn is essential for the development of vaccines conferring sterile

protection and adjunct therapies such as immune therapy, to prevent and treat disease complications. While vaccines would be a very cost-effective method to combat malaria, finding a vaccine able to elicit sterile protection in humans has been difficult. Despite 75 years of focused research (in the case of *P. falciparum* malaria) and reports already suggesting in the late 1960's that sterile protection can be elicited in mice using radiation-attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites (3), an effective malaria vaccine has yet to be developed. An ideal vaccine would be: safe; easy to manufacture; easy to administer; cheap; and, when administered in infancy, confer life-long immunity against all forms of the disease.
Many factors make malaria vaccine development challenging (4). First, the parasite changes through several life stages in the human host, presenting a different subset of molecules to the immune system at each stage (4). Second, the parasite has evolved a series of strategies that allow it to confuse, hide, and misdirect the human immune system (4). Third, it is possible to have multiple, simultaneous malaria infections of not only different species but also of different strains, indicating that even the immune response to the live parasite is more complex than is the case with most other infectious diseases. Finally, the size and genetic complexity of the parasite mean that each infection presents thousands of antigens to the human immune system. Understanding which of these can be a useful target for vaccine development has been complicated. Different antigens have been used as targets for vaccination (5) and the institute where this research is going to be carried out has had an in-house vaccine development program for more than 25 years (ref 6 and references therein).

The only subunit vaccine thus far to demonstrate reproducible evidence of low to moderate protection is the GSK (GlaxoSmithKline Vaccines) candidate RTS,S (also known as Mosquirix™) developed in Belgium (7). Although RTS,S is not able to bring about sterile protection it seems to reduce the incidence of cerebral malaria (7). The caveats, complexities, risks and cost implications of this vaccine led experts from the European Medicine Agency to define it as "a complicated vaccine requiring a complicated recommendation" (8), indicating the need for the development of better vaccines.

Clinical development of vaccines against infectious agents is a lengthy and costly process, particularly challenging for those diseases (such as malaria) for which immune responses conferring protective immunity are unknown. In those cases, vaccine candidates have been developed largely by applying trial and error strategies. This requires testing of each vaccine candidate in humans through conducting large controlled clinical trials, subjecting participants to experimental or natural challenge by the pathogen to assess protection (5, 9). The limited success of these strategies in the case of RTS,S / Mosquirix™ (the best vaccine available, to date) has highlighted the need for more research into the mechanisms underlying malaria immunity and pathogenesis. It has become increasingly clear that, while pursuing trial and error approaches is inevitable at present, our continued failure to develop an effective malaria vaccine is partially related to our limited understanding of the immunity to malaria (e.g. immunological memory in malaria, which differs from other infectious diseases), the lack of research into the factors underlying differential susceptibility and the absence of established correlates of protective immunity. Research into the latter has been hampered by the impossibility to look at tissue (e.g. liver, spleen, lymph nodes, bone-marrow) immune responses in humans, which are thought to critically contribute to a protective malaria vaccine effect. In humans, namely, sampling is limited to the blood. Ultimately, it has become clear that this lack of insights hinders the rational design of better therapies for malaria and that the success of a vaccine against malaria hinges on our ability to understand parasite-host interactions defined as the molecular interactions between the malaria parasite and the immune system of the patient, which result from the interplay between the genetic background of both host and parasite strain, host immune response and parasite virulence.

Plasmodium parasites have a narrow host preference; there are *Plasmodium* species that infect birds, reptiles, rodents, monkeys and humans. While most *Plasmodium* parasite-host combinations are generally very specific, most monkey malarias infect also humans and some are important zoonoses. Experimental models of the two most important human malarias (*P. falciparum* and *P. vivax*) are limited to chimpanzees, *Aotus* en *Saimiri* monkeys. The parasites must be adapted to these monkeys and most of the time it is necessary to splenectomize such animals to obtain blood stage infection with these parasites. Due to these restrictions and to the very limited availability of these monkey species for biomedical research, these models are rarely used, however valuable they may be (10). *P. ovale* and *P. malariae* suffer from the same

limitations in terms of available models. *P. knowlesi* is a zoonosis that can be modeled in macaques or marmosets.
As human parasites are difficult to study in experimental models and studies in humans are restricted for a variety of ethical reasons, simian parasites in non-human primate (NHP) models offer the most relevant parasite host combinations for the study of human malarias. The modelling of complex pathophysiological events involving the immune system aimed at understanding the regulatory mechanisms underlying the interplay between the parasite and its host in order to design and evaluate adjunct intervention strategies and effective vaccines, cannot be achieved using *in vitro* models and requires intact parasite-host combinations. Such combinations have the added value to allow for insights into combinatorial biomarkers from the lymphoid tissues and other organs (in addition to peripheral blood), which cannot be measured in the human immunization models but where the bulk of the immune response is expected to occur. Simian parasite-NHP combinations are the species of choice to conduct these studies because the immune system in NHP is closely related to that of humans and the infection of non-human primates with simian parasites best reflects the different aspects of human disease. Non-human primate *Plasmodium* infection models have been developed that are relevant for each human host-parasite combination to allow for the study of parasite-host interactions. *P. knowlesi*, *P. coatneyi* and *P. fragile*-NHP combinations are good models for the human *P. falciparum* malaria, *P. brasilianum*-NHP combinations are good models for the human *P. malariae* malaria and *P. simiovale, P. cynomolgi* and *P. fieldi* are good models for the human *P. ovale* and *P. vivax* malaria, respectively. *P. knowlesi* is a zoonosis meaning that the parasites infect both non-human primates (chiefly macaques) and humans. The infection in non-human primates can therefore be used as a model of human malaria. While macaques will be generally used as the standard NHP model species, a limited number of marmosets are also used to model specific aspects of human disease (11). Compared to the macaque, due to the small size of the animal, this model offers the possibility of applying live imaging techniques to the study of host-pathogen interactions.

A high level of heterogeneity (e.g. multiple infections, inter-human differences as to immunological status at infection, large differences in diet, age etc.) characterizes human infections in the field making it very difficult to determine the key factors underlying disease control and disease progression into complications. The use of NHPs in a controlled environment, infected with one parasite at a time, gives a unique opportunity to study the interplay between genetic background, host immune reactions and parasite virulence. This control of infection may be modulated by innate and adaptive immune mechanisms that may be different between the different macaques. The non-human primate population at the institute where this research is going to be carried out is outbred and can therefore better represent the large variation of human population than would an inbred population. Furthermore, the macaque colony at the institute are typed for their MHC and Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) thus making it possible to follow KIR phenotypes during the course of the malaria infection. The technology has also been developed to type MHC and KIR cells of marmosets for specific experiments. If rhesus macaques originating from China will be used, they will first be MHC-typed and KIR phenotypes will be determined, then be followed during the experiment as for all other animals. Furthermore, applicability to the human situation is always a question of validation in the specific context in which the specific results of host-pathogen interactions and biomarkers need to be applied.

Malaria is a complex disease that gives rise to many different physio-pathological manifestations in humans. The use of different combinations of parasites and animal hosts will allow us to look at parasite-host interactions that reflect different characteristics of the human disease (asymptomatic all the way through to malaria complications) and in some cases different aspects of the particular disease presentation (e.g. anaemia). Understanding the parasite-host interaction mechanisms that underpin these different manifestations is essential to target them with the appropriate tools (drugs, vaccines). Using different NHP species and origins (*Macaca mulatta*, *M. fascicularis*, *Callithrix jacchus*) in combination with different NHP malarias, we have unique models that reproduce the different aspects of malaria in humans. In terms of NHP malaria hosts, the rhesus macaque is characterized best, followed by the cynomolgus macaque and the marmoset, the latter being the least characterized at this point. However, these models are expected to provide complementary insights that contribute to the same goal of a better understanding of parasite-host interaction and of the cross-talk between the parasite and the host immune system, which is required in order to develop effective vaccines and adjunct therapies. The marmoset model will only be used for testing vaccines and adjunct therapies after the model has been fully characterized and when the target parasite or the specific disease presentation and only when the

therapy cannot be assessed in macaques. For example, a comparison of the in-depth sequencing information gained from the different models, will make it possible for us to uncover variables related to disease susceptibility and differential progression. Also, we will be able to investigate the mechanisms underlying disease susceptibility and progression in terms of critical biological pathways resulting in possible drug targets for therapies.

Although biomarkers for malaria are much needed (2), this is difficult to pursue in patients as these are quickly treated after admission to the hospital/clinic. Human malaria biomarkers research is therefore always done *a posteriori*, trying to interpret a range of heterogeneous data marred by all sorts of confounders. At present, very limited useful insights have emerged from this *a posteriori* approach. The use of a well-characterized model, will allow us to disentangle true malaria host-parasite interactions and biomarkers from the confounders, which are typical of the field situation (underlying conditions, multiple infectious diseases etc.).

At the institute where the study will be carried out there is a lot of experience in working with simian malaria parasite in non-human primates to investigate mechanisms of immunity and pathogenesis that can be exploited for the design of innovative anti-malaria therapies. The institute has conducted an own in-house vaccine development program for ±40 years and had thus a wealth of experience in assessing the safety and immunogenicity of vaccine candidates, evaluating novel vaccination strategies and adjunct therapies. Furthermore, there is a great deal of experience in using 'omics and systems analysis to uncover and validate gene targets for drug and vaccine approaches as well as combinatorial biomarkers.

The applied studies which will be carried out in this framework include:

- The assessment of vaccines and vaccination strategies in NHP parasite-host combinations relevant to human malaria infections;
- The assessment of adjunct therapies for malaria aimed at potentiating the immune system, at interfering with pathways and mechanisms underlying the development of malaria and malaria complications;
- The characterization of parasite-host interactions in specific NHP parasite-host combinations with defined genetic background and/or origin;
- The optimization and refinement of NHP models for human malarias;
- The identification of combinatorial biomarkers for the different stages of illness and surrogate biomarkers of protection, as well as immune correlates;
- Host tissue harvesting for 'omics, immunological and system analysis studies in limited cases in which host-mechanisms underlying parasite-host interactions (e.g. local immunity or inflammatory response in specific organs) needs to be investigated to define combinatorial biomarkers;
- *In vivo* transfection studies of simian parasites, which cannot yet be cultured *in vitro* to validate specific target genes for therapies emerging from 'omics and systems biology studies and the study of *in vitro* manipulated (*P. knowlesi*) parasites *in vivo*.

3.2 Purpose

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

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

The overall objective of this project is the contribute to the development of vaccines, vaccinations strategies and adjunct therapies that are able to protect populations living in endemic areas as well as risk groups traveling to countries where malaria is still present. This aim will be achieved through a research strategy that combines the study of parasite-host interactions in NHP parasite-host combinations relevant to human malarias with the direct assessment of novel vaccine candidates, innovative vaccinations strategies and adjunct therapies. Such candidates and strategies are developed in collaboration with international consortia comprising industrial and academic partners and chosen

based on evidence derived from literature and other *in vivo* studies about their potential. In terms of parasite-host interactions the aim will be to uncover the key factors involved in the cross talk between the parasite and the host's immune system during the blood and liver stages of the malaria parasite life cycle in different non-human primate (NHP) species and origins using 'omics (proteomics, transcriptomics, metabolomics), immunological, molecular and parasitological approaches. As disease is only seen due to blood stage malaria and this is clinically the most relevant stage, we will start with investigations of blood stage malaria in NHP. At a later stage we will also include liver stages, as they are also very relevant for vaccine development. Understanding the key factors involved in parasite-host interactions will inform the development of effective vaccine against malaria and may also give us insights into pathways that can be targeted using drugs. On the way, to the development of vaccines and drugs, these key factors will initially be used to define (bio)markers of susceptibility to malaria and disease progression into malaria complications (different forms of malaria disease). In this context, we aim at establishing combinatorial biomarkers for the different stages of illness and surrogate biomarkers of protection, as well as immune correlates. The increased knowledge of the specific mechanisms underlying the illness and the immune response can also be used in the future for training in silico prediction models that would reduce the number of animals used in vaccine experiments and refine such experiments.

At this moment, the institute at which this research is carried out is the only one in Europe with routine experience in the study of NHP malaria parasites. Particularly important for such studies is the institute's unique combination of experience in the study of NHP malaria parasites in non-human primates (12), 'omics technologies and systems analysis (13). With this unique set of experiences and knowledge gained through years of work in the field, the feasibility of the proposed project can be considered very high.

Referenties

1. WHO, The Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030, January 2016
2. Andrade BB, et al. Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106 Suppl 1: 70-8
3. Nussenzweig, R., J. Vanderberg, and H. Most, *Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of Plasmodium berghei. IV. Dose response, specificity and humoral immunity.* Mil Med. 1969; 134(10): 1176-82
4. https://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/vaccine-development/life-cycle-malaria-parasite;); Wipasa J, Elliott S, Xu H, Good MF. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. Immunol Cell Biol. 2002 Oct;80(5):401-14
5. *Vaccines Against Malaria: Hope in a Gathering Storm*, P.K. Russell and C.P. Howson, Editors. 1996: Washington (DC)
6. 10.2.g [redacted]
7. Partnership SCT (2015) Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised controlled trial. *Lancet* 2015; 6736(15)
8. https://www.reuters.com/article/health-malaria-vaccine/insight-caveats-costs-and-complexities-shadow-first-malaria-vaccine-idUSL8N0ZG3UE20150714
9. Tuju J, Kamuyu G, Murungi LM, and Osier FHA Vaccine candidate discovery for the next generation of malaria vaccines Immunology. 2017 Oct; 152(2): 195–206
10. Thomas D, Tazerouni H, Sundararaj KG, Cooper JC Therapeutic failure of primaquine and need for new medicines in radical cure of Plasmodium vivax. Acta Trop. 2016;160:35-8
11. Langhorne J and Cohen S. Plasmodium knowlesi in the marmoset (Callithrix jacchus) Parasitology. 1979 Feb;78(1):67-76
12. 10.2.g [redacted]

13. 10.2.g
14. Guilbride et al. PLoS One 2010, 5, e10685; Guilbride et al. Trends Parasitol 2012, 28, 142-150

3.3 Relevance

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

In order to tackle knowledge gaps in malaria vaccine development it is necessary to investigate parasite-host interactions in models relevant to human malarias.

NHP models of human malarias have a special place in this research due to the high relatedness of the immune system of NHP and humans and due to the fact that the infection of non-human primates with simian parasites best reflects the different aspects of human disease.

Currently, the research questions tackled in this application are clinical in nature and will in the long run have practical implications for the development of effective vaccines, as a thorough understanding of parasite-host interactions will lead to new ways to interfere and provide better immunity to malaria infection. Furthermore, the study of parasite-host interactions is of more fundamental nature and will yield insights in a number of important pathways. Some of the emerging pathways in malaria parasites may be good drug targets, which can further be validated to provide anti-malarial therapies.
A better understanding of parasite-host interactions and the availability of validated combinatorial biomarkers would for example:

1. allow for the development of better biomarkers for malaria complications, to differentiate true clinical malaria from other diseases with a similar presentation when malaria parasitaemia is coincident (particularly where parasite prevalence is high so that most people will be infected but not necessarily symptomatic), allowing clinicians to identify appropriate treatments.
2. provide a tool to distinguish the different malaria syndromes (uncomplicated, mild and complicated)
3. provide prognostic indicators for clinical trials and epidemiology studies
4. allow further investigation into the mechanism(s) of disease by using biomarkers to identify critical biological pathways to support the development of new therapies for malaria complications.

While the study of parasite-host interaction to address questions concerning the vaccination paradigm by testing innovative theories in the realm of vaccine efficacy and failure including e.g. the hypothesis that sporozoites in the skin may induce tolerance (14) is a long-term strategy, the urgent need for vaccines requires also more short-term strategies. In parallel, to our studies of parasite-host interactions, which will inform malaria vaccinology study now and, in the future, we will therefore continue our efforts aimed at the study and assessment of new malaria vaccine candidates and malaria vaccine strategies (e.g. vaccination under chemoprophylaxis) directly aimed at finding new, more effective vaccines that will elicit (ideally life-long) sterile protection. The study and assessment of new adjunct therapies will offer new tools to treat malaria complications or prevent them e.g. by tweaking the immune system's own response when biomarkers of disease progression into complications are detected, by interfering with pathways and mechanisms underlying the development of malaria complications etc.

3.4 Research strategy

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

The project consists of three different components: the study of parasite-host interactions in NHP models relevant to human malarias (component 1), the assessment of new vaccine candidates and vaccination strategies (component 2) and the assessment of adjunct therapies (component 3).
The different components are in principle independent of each other but should be seen as complementary as knowledge acquired in component 1 will always be used to inform research into components 2 and 3. The research on the three components can therefore take place in parallel.
Research carried out under component 1 is part of a long-term strategy to address the gap in malaria vaccinology. It aims primarily at devising a more rational approach to the design of vaccine strategies

aimed at eliciting sterile (ideally life-long) immunity against malaria. Research carried out under components 2 and 3 follows traditional malaria vaccinology approaches such as vaccine trials and should be considered a short-term strategy aimed at addressing the urgent need for a malaria vaccine and adjunct therapies.

Components 2 and 3, will cover all aspects of malaria vaccinology and adjunct therapies. This will include, but not be limited to the assessment of safety, immunogenicity and efficacy of vaccine candidates, vaccine components (e.g. adjuvants), vaccine formulations and adjunct therapies. When necessary, this may include e.g. dose escalation and pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD experiments aimed at finding the right therapeutic dose. The assessment of new vaccine strategies (e.g. vaccination under chemoprophylaxis) will include, but not be limited to the testing of radical new thinking and immunological models with major implications for vaccine efficacy/failure and strategies aimed at modulating critical pathways involved in the pathophysiology of malaria.

Next to the applied aims of components 2 and 3, the study of the parasite-host interactions (component 1) in this project will increase our understanding of the mechanisms behind the pathogenesis of and the immunity to malaria using NHP models relevant to human malarias e.g. specific parasite-host combinations best reproducing specific aspects of human disease. We will also attempt to uncover and validate combinatorial biomarkers for the different stages of illness and surrogate biomarkers of protection, as well as immune correlates. Component 1 is an important aspect of the research strategy at it will contribute critical knowledge to the refinement of studies in components 2 and 3 and pave the way to a more rational design of new ways to interfere with the disease and provide better immunity to infection. This component will include (but not be limited to) the study of the cross-talk between parasite and immune system, the characterization of infection in specific parasite-host combinations (e.g. specific genetic background), the mechanisms underlying specific disease presentations. These studies will be carried out through immunological and parasitological approaches, the global screening of host immune responses using omics technologies, and the registration of different clinical parameters (e.g. hematology, clinical chemistry etc.) during and after studies (using stored biomaterials and samples). All samples (e.g. serum, blood cells, tissue samples, RNA etc.) collected during studies under components 1, 2, 3 will be either used on-line or stored for future use in our experimental biobank.

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 and second component the type of animal experiment will be the malaria infection of NHPs (macaques **(appendix 1)** and/or marmosets (**appendix 2**). Here, NHPs are infected with a specific simian malaria parasite strain to model and study specific aspects of human infection and human disease. Blood drops are taken to monitor the parasitemia course, while blood samples are taken to monitor clinical chemistry, hematology and isolate cells from the blood compartment (e.g. immune cells). If necessary for the scope of the study, animals are sacrificed at the end of the study to harvest tissues and isolate e.g. tissue immune cells. This may for example be the case when the response to infection needs to be assessed also in the tissues where the bulk of the immune response against to malaria is known to occur.
In the third component the type of animal experiments will be malaria infection in rhesus macaques **(appendix 1)**. Here the rhesus macaque will be infected with the most appropriate simian parasite to study the efficacy of the vaccine or adjunct therapy that needs to be assessed e.g. with either *P. knowlesi* or *P. coatneyi* (to mimic *P. falciparum*), with *P. cynomolgi* (to mimic *P. vivax*) etc. The assessment of vaccine and adjunct therapies will be designed as required by the specific strategy or candidate to be tested, minimally to include always a control group and an experimental group. **(appendix 1)**. Additionally, it may be necessary to carry out PK/PD studies in some instances where the right dose of a therapeutic is not known *a priori* and cannot be inferred from existing data **(appendix 3)**. Donor animals may be required for some of these studies (e.g. studies using sporozoites as vaccines or for challenge). Procedures for these instances do not different from standard malaria infection of NHPs as described in **(appendix 1)**.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

The different components form the extended sequence of conventional vaccine development platforms. Component 1 reflects aspects of the discovery in the vaccine development pipeline such as infection and disease modelling, combinatorial biomarker research and the study of mechanisms underlying immunity to malaria. A better understanding of the cross-talk between the malaria parasite and the host immune system will allow for the rational design of vaccine strategies aimed at eliciting sterile (ideally life-long) immunity against malaria and thus directly impact vaccine development.
Component 2 and 3 reflect the more applied aspects in the vaccine development pipeline such as the pre-clinical assessment of vaccine candidates and adjunct therapies for their safety, immunogenicity and efficacy as well as research into innovative vaccine strategies based on radical new thinking and immunological models with major implications for vaccine efficacy/failure.
As in this case discovery is not related to uncovering of new vaccine candidates
The components are independent although it is expected that knowledge gained in component 1 will always inform research into components 2 and 3. PK/PD studies and dose escalation experiments are sub-components of components 2 and 3 and will only be carried out when the therapeutic dose needs to be established because it is unknown and cannot be inferred from
available data. Studies of the different components will be carried out in parallel. Knowledge gained in component 1 (e.g. combinatorial biomarkers) will be used to refine studies in components 2 and 3. Studies within a specific component will be carried out sequentially e.g. first PK/PD studies, then efficacy studies etc.

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	Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in macaque models relevant to human malaria
2	Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in marmoset models relevant to human malaria
3	PK/PD studie in rhesus macaques
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

[redacted]

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: Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in macaque models relevant to human malaria

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.

Novel vaccine candidates and innovative vaccination strategies are typically tested using a control group and an experimental group. In specific cases, this design may require additional control groups e.g. a relapse monitor group (in the case of relapsing parasites); a comparative vaccine (e.g. RTS,S/ASO1) group etc. In some cases, it may be necessary to define the most appropriate therapeutic dose of a specific vaccine (e.g. in the case of vaccinations with live sporozoites, irradiated sporozoites, cryopreserved sporozoites, genetically attenuated parasites (GAP) etc.) prior to challenge. Thus, more than one experimental group might be needed. When testing adjunct therapies (such as immuno-therapies) it may be necessary to carry out PK/PD studies beforehand to establish the right dose e.g. of an antibody to be administered by e.g. defining its serum levels. These studies will only be necessary if the dose has not been established with certainty in preliminary tests (e.g. in rodents, in vitro) and cannot be inferred from existing data. While vaccines will be administered prior to challenge, adjunct therapies are in general tested during an on-going malaria infection to see if they are able to prevent e.g. certain disease manifestations, specific complications or the progression of the disease.

Criteria used for the testing of vaccines, vaccine strategies and adjunct therapies include:

- Vaccine candidates and formulations to be tested need to be of a sufficient quality to be used in animals. It must have been shown or be plausible to assume that such compounds to not comprise elements that can cause serious side effects in animals;

- Only the most promising vaccine candidates and formulations will be tested in non-human primate models. Screening of candidates will be done in vitro and in rodent species prior to selection of candidates for non-human primate vaccine studies.
- Adjunct therapies will only be tested in non-human primates when it is clear that the non-human primate model has advantages over in vitro or in rodent testing. This may be the case e.g. if the pathophysiological mechanism the adjunct therapy is expected to interfere with is different in rodents than in non-human primates and humans; if a specific cascade is absent or different in rodents and humans
- There is a hypothesis with regard to the presumed mechanism of action of the vaccine, vaccine strategy or adjunct therapy, which is based on scientific knowledge of the course of malaria infection or the immune response of the host to the infection.
- The assessment of new vaccine strategies (e.g. vaccination under chemoprophylaxis) will include, but not be limited to the testing of radical new thinking and immunological models with major implications for vaccine efficacy/failure and strategies aimed at modulating critical pathways involved in the pathophysiology of malaria

The primary outcome parameter in vaccine studies is the level of protection from malaria after homologous and/or heterologous challenge. In the best-case scenario, a vaccine or vaccine strategy is able to provide the subject with long-term (ideally: life-long) sterile protection. In the best-case scenario, an adjunct therapy is able to prevent a specific disease manifestation, a complication or the progression of the disease.

Studies of parasite-host interaction/malaria disease modelling in non-human primates

As human parasites are difficult to study in experimental models and studies in humans are restricted for a variety of ethical reasons, the modelling of complex pathophysiological events involving the immune system requires intact parasite-host combinations. The modelling of complex pathophysiological events is crucial for the understanding of the regulatory mechanisms underlying the interplay between the parasite and its host. Knowledge of such mechanisms will make it possible to design effective vaccines and adjunct intervention strategies. Simian parasite-NHP combinations are the species of choice to conduct these studies because the immune system in NHP is closely related to that of humans and the infection of non-human primates with simian parasites best reflects the different aspects of human disease. A high level of heterogeneity (e.g. multiple infections, inter-human differences as to immunological status at infection, large differences in diet, age etc.) characterizes human infections in the field making it very difficult to determine the key factors underlying disease control and disease progression into complications. The use of NHPs in a controlled environment, infected with one parasite at a time as models for malaria infection, gives a unique opportunity to study the interplay between genetic background, host immune reactions and parasite virulence. In this context, the animal colony of at the institute in which the research is going to be carried out has several advantages: animals are typed for immune markers (e.g. MHC, KIR) and the colony is outbred and thus better represents the large variation of human population. Macaque models of malaria are better characterized than marmoset models and are thus initially the model of choice, particularly for vaccine studies. In the context of parasite-host interactions, as described in detail in appendix 2, the marmoset has specific advantages that are expected to yield complementary insights on the immune system and will therefore be used in a limited number of cases to model e.g. malaria susceptibility and specific disease presentations. The rhesus macaque is the experimental host of some simian malaria leading to a disease presentation that is more acute than in the natural host, the cynomolgus macaque. Comparison of biomarkers of infection, protection and immune correlates may help explain how the cynomolgus macaque is able to control the infection in ways that the rhesus macaque does not leading to a better understanding of what mechanisms we need to trigger during vaccination to control and ultimately prevent the infection.

In studies of malaria parasite-host interactions the primary outcome will depend on the purpose of the study in question e.g. correlates of immunity, biomarkers of protection or disease course.

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

In the case of a study aimed at the evaluation of a vaccine and vaccine strategy, the administration of the vaccine will take place before the challenge with a specific malaria parasite or parasite strain. The length of this phase depends on the vaccination strategy e.g. primary immunization only, primary immunization followed by several booster vaccinations, vaccine administration under chemoprophylaxis

or other. Typically, the length of this phase is between 12 and 28 weeks. Adjunct therapies (e.g. therapeutic or immune-modulatory regimes) are generally administered after parasite infection.

Vaccines and adjunct therapies can be administered through a number of different routes (intradermal, subcutaneous, intravenous, intramuscular, mosquito bites etc.) and with a frequency that strictly depends on the type of substance e.g. its half-life, solubility, formulation.

Parasite infections (e.g. study of parasite-host interactions; challenge during a vaccine or adjunct therapy study) are performed under sedation through direct intravenous, subcutaneous or intradermal injections; mosquito bites can also be used to better mimic the field situation. The choice of a specific parasite infection route strictly depends on the purpose of the experiments and the questions at hand. In parasite-host interaction studies the type of parasite-host combination chosen will determine the nature of the infection. The nature of infection is a primary parameter in the study of disease presentation, disease mechanisms and disease progression; immunity to malaria; biomarkers of susceptibility, protection, immune correlates. A specific parasite-host combination is chosen based on the purpose of the experiment, the experimental question to be answered, the relevance of the model for human disease. The model chosen in turn influences the frequency with which specific biotechnical procedures need to be carried out including e.g. the type of drug treatment that needs to be applied at the end of the experiment to cure the animals

Small blood draws are carried out through a needle prick in the thigh of an infected animal e.g. to monitor the parasitemia.

Larger bleedings are always performed under sedation e.g. to measure clinical chemistry and hematology parameters, to isolate immune cells to perform immunological assays, for 'omics studies etc. The frequency of larger blood withdrawals depends on the purpose of the experiment. In general, blood volumes to be taken will not exceed a maximum of 1% of the body weight per 4 weeks (and 0.7% max per bleeding).

Skin biopsies and liver biopsies may be applied to study the immunity to the pre-erythrocytic phase of the malaria infection, which has been recognized as an attractive vaccination target (Nat Rev Microbiol. 2013 Oct;11(10):701-12). Until now, some intravital studies as well as skin biopsies have been performed in rodents for analysis of early pre-erythrocytic immunity. However, it is unclear how relevant these studies are to the human situation given that mouse immunity can be considerably different from human immunity to malaria. Skin and liver biopsies are performed to study the early timepoints directly after infection with sporozoites and their migration to the liver and allow to test innovative theories according to which e.g. sporozoites in the skin may induce tolerance (Guilbride et al. PLoS One 2010, 5, e10685 and Guilbride et al. Trends Parasitol 2012, 28, 142-150). In monkeys, biopsies will be carried out under sedation and the animals will receive analgesics. The spot of skin biopsies will be stitched. Prior to liver biopsy, the coagulation cascade will be tested as to reduce the risk of haemorrhagic events. The liver biopsy procedure will be guided by an ultrasound.

Treatment of blood stage malaria is performed through i.m. injections with antimalarial drugs. If a monkey is infected with sporozoites of a NHP malaria species that forms hypnozoites, the monkey will receive the standard radical treatment comprising anti-blood stage drugs (i.m. injections) and specific anti-liver stage drugs (oral administration). Animals are trained to cooperate with procedures such as i.m. administrations, oral administration and small blood draws through positive reinforcement training.

In studies in which it is necessary to look at the tissue (e.g. liver, spleen, lymph nodes, bone-marrow) immune responses (which cannot be looked at in humans), which are thought to critically contribute to a protective effect against malaria, the euthanasia will take place on fixed endpoint unless human endpoints are reached beforehand (which is unlikely to be the case).

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

The primary outcome parameter in vaccine studies is the level of protection from malaria after homologous and/or heterologous challenge. In the best-case scenario, a vaccine or vaccine strategy is able to provide the subject with long-term (ideally: life-long) sterile protection. The primary outcome parameter for adjunct therapies is their ability to prevent a disease manifestation a complication or the

progression of the disease as a whole. In the best-case scenario, an adjunct therapy is able to prevent a specific disease manifestation, a complication or the disease as a whole. In studies of malaria parasite-host interactions the primary outcome will depend on the purpose of the study in question e.g. correlates of immunity, biomarkers of protection or disease course. The number of animals will be restricted to the minimum necessary to obtain statistically significant data. Each study will be preceded by a thorough statistical analysis to determine the minimum number of animals per group necessary to achieve the aims of each study. In parasite-host interaction studies this may include, but is not limited to, the use of a priori sample size algorithms for multiple regression, that are able to estimate sample-size and power in R by exploring simulated study outcomes; in vaccine power studies different statistical methods can be applied depending on the scope of the study such as Fisher's exact test; Kaplan-Meier survival curves tested with log-rank tests; parasitemia courses over time can be modelled using non-linear mixed effects models (NLME). An increased knowledge of the specific mechanisms underlying the illness and the immune response gained through the study of parasite-host interactions can also be used in the future for training *in silico* prediction models that would reduce the number of animals used in vaccine experiments and refine such experiments. Whenever possible control groups and donor monkeys will be combined between studies.

B. The animals

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

Macaca mulatta (adult; female and male). Estimated number of animals: ca. 85 animals over a total of 5 years; *Macaca fascicularis* (adult; female and male). Estimated number of animals: ca. 40 animals over a total of 5 years:

The 85 rhesus macaques will be used in parasite-host interaction studies aimed at e.g. disease modeling, research into the mechanisms behind malaria immunity, the definition of biomarkers of protection, disease progression and immune correlates, and in studies of the safety, immunogenicity and efficacy of novel vaccine candidates, innovative vaccine strategies and adjunct therapies. By application of the appropriate statistical modeling (e.g. power calculation) on a case by case basis as described above, the animal group size will be determined depending on the type (e.g. vaccine and adjunct therapy studies, parasite-host interaction studies) and purpose of the experiment. Based on our experience, the group size can vary between 4 and 8 animals per group. The group composition will be homogenous. The animals will be coming from the institute's own colony and only in special cases be sourced from an authorized importer following EU guidelines. In general, for the study of vaccine and adjunct therapies an experimental (vaccinated) and control group will be used. However, in some cases it may be necessary to diverge from this standard experimental design and introduce additional groups e.g. a relapse monitor control group (in the case of studies with relapsing parasites); a vaccine comparison group (e.g. RTS,S or other) in the case of comparative vaccine efficacy studies. A number of donor monkeys may need to be used e.g. when immunization, challenge or parasite host interaction studies require obtaining sporozoites or when experimental animals need to be infected with a NHP-passaged stock.

The parasite-host combination chosen each time will be the best one for the purpose of the experiment. Vaccine studies under this proposal will in general be carried out using the well-established standard models *P. knowlesi*-rhesus macaque as a proxy for *P. falciparum* human malaria and *P. cynomolgi*-rhesus macaque as a proxy for *P. vivax or P. ovale* human malaria. Only on rare occasions and for specific purposes (e.g. evaluation of therapies for *P. malariae* human malaria) we may opt for another parasite-host combination and only if it better represents the human malaria than the standard combinations for a particular aspect of the disease. Parasite-host interaction will be evaluated in the model that is best suited to answer the questions at hand e.g. on the mechanisms behind a specific malaria disease presentation, on specific aspects of the immunity to malaria, on specific aspects of the interplay between genetic background, parasite virulence and host immune system etc.
In some cases, when parasite-host interactions are the object of study, it may be necessary to compare the infection in rhesus monkeys with the infection in cynomolgus monkeys. While the rhesus monkey is an experimental host for several simian malaria parasite species and strains, the cynomolgus monkey is a natural host. The disease presentation, the ability to control parasitemia and the susceptibility to infection often varies for a specific parasite species or strain between experimental and natural host. These differences are likely based in differences in the native and innate immunity to malaria between the rhesus and the cynomolgus macaque, which are valuable in parasite-host interaction studies as they may lay bare biomarkers of disease progression, disease control, protection and immune correlates. Also,

understanding the mechanisms behind the differences in immunity to malaria between rhesus and the cynomolgus macaque may highlight new avenues of treatment e.g. new targets for vaccine and adjunct therapies.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals to be used in these experiments, may have been used in other studies. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal frameworks described in art. 1e of the law on animal testing.

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

☒No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement.
No *in vitro* system exists to date that can reproduce the complexity of an organism's immune system. These experiments need to be performed in live animals, because we need to investigate the reaction to vaccination and challenge of the different soluble and tissue components of the immune system to determine the safety and efficacy of vaccines, vaccine strategies and adjunct therapies. In this context, we will test radical new thinking and immunological models with major application for vaccine efficacy/failure; and conduct parasite-host interaction research aimed at uncovering the immune responses conferring protective immunity to malaria; the mechanisms behind the variable susceptibility to malaria resulting in different disease presentations; biomarkers of protection, disease progression and complications and correlates of immunity for malaria vaccines. Ultimately, the combination of these insights will lead to the rational design of better therapies for malaria.
Whenever new vaccines are being tested in non-human primates, preliminary rodent experiments have usually been conducted to test safety, immunogenicity and efficacy. As a next step, we use the non-human primate malaria models, as the immune system of the non-human primate and of humans has great similarity in the response to malaria infection. To answer some of the questions underlying vaccine efficacy and vaccine failure, as well as to conduct research into correlates of protection, rodent models are inadequate, as we need a host that is as closely related to humans as possible. Adjunct therapies and vaccines strategies are also tested in mice or experimental models of human malaria (CHMI), but there are a number of significant limitations to the insights that can be obtained using these models.

The immune system of rodents is significantly different from that of humans when it comes to the response to malaria, specific human disease presentations cannot be accurately modelled in rodents and the study of parasite-host interactions is thus limited to mechanisms that show commonalities between rodents and humans (Trends Parasitol. 2010 Jan; 26(1): 11–15). Controlled Human Malaria Infection (CHMI) models have a number of disadvantages:

- they are limited to *P. falciparum*;
- no tissue sampling is possible in humans, although the bulk of the protective immune response to malaria happens in the tissues;
- patients need to be cured at a low parasitemia, which limits the possibility to assess immune mechanisms;
- limited amounts of (*P. falciparum*) parasite strains for heterologous challenge are available and highly standardized parasite and strains are difficult to establish (e.g. in the case of blood stage CHMI),
- no standardized CHMI methodology and reagents across different centres (*Infect. Immun. January 2018 vol. 86 no. 1 e00479-17)*

The study of vaccines in the *P. knowlesi-Macaca mulatta* infection model has the advantage that it bears strong resemblance to *P. falciparum* human malaria. Not only is *P. knowlesi* malaria a human zoonosis, but macaques, like humans can be infected several times and have a similar response to infection. Furthermore, as we intend to culture the parasites in the plasma of the vaccinated animals and untreated controls from the day of challenge infection, it is important to use a *Plasmodium* species that can be cultured *in vitro*. *P. knowlesi* together with *P. falciparum* is the only *Plasmodium* species that has successfully been adapted to long-term *in vitro* culture. As detailed in the application, the parasite-host combinations, which will be chosen, will be selected based on the relevance for the different human malarias.

Reduction. The donor monkeys are used efficiently in that in transmission experiments, we are feeding the maximum number of mosquitoes, which we can handle in each experiment (1000-1500), to yield large numbers of sporozoites for further studies. Efficient use will be made of infected blood harvested from donor monkeys (e.g. immunological, 'omics, parasitological studies will be carried out), thus reducing the number of monkeys needed for infection.
Whenever possible, donor monkeys and control groups will be combined between experiments.
Prior to vaccine and adjunct therapy studies as well we prior to parasite-host interaction studies, the minimum number of animals required to obtain significant results will be determined using appropriate statistical methods. The statistical method may vary depending on the type and scope of the experiment and will be specified in the IvD protocol.

Refinement. The blood-stage parasitemia of NHP-parasites in rhesus monkeys is reasonably predictable, both in the case of blood stage and sporozoite infections. Through this knowledge we can restrict the needed thigh pricks to a minimum (in any case in parasite infections that have been used in rhesus monkeys before). For "uncharacterized" parasites the parasitemia development may be less predictable, but in such cases, we plan thigh pricks strategically around periods in which parasites are being expected to reduce the discomfort for the animals, while being able to follow the parasitemia development accurately nonetheless. Moreover, we are using trained animals (positive reinforcement training), which voluntarily offer their thigh for a prick, after which they receive a reward. This reduces the stress for the animals. The mosquito feedings on sporozoite donors are performed *ex vivo*, so that the animals do not suffer from the mosquito bites. After infection, the animals are scored daily to assess clinical symptoms by using a clinical scoring list. Appropriate human endpoints will be in place to prevent animal suffering in unforeseen circumstances.

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

The malaria infection itself gives mild malaria symptoms (at higher parasitemia), such as fever, anaemia, decreased appetite and reduced activity when the parasite ruptures from the infected red blood cell. Analgesics will be used in the case of biopsies. Animal caretakers check the animals on a daily basis and warn the researcher when needed. The development of the infection is closely watched and the infection is immediately cured if the above-described symptoms of infection worsen or continue for more than half a day. Human endpoints are determined beforehand to limit the discomfort in unforeseen circumstances. The use of trained animals, as described above, reduces the stress the animals experience during handling.

Environmental effects. NHP parasites are class 2 organisms and experiments with these parasites are carried out under containment level 2. Infected mosquitoes are handled in a specially equipped mosquito laboratory, where the work protocols focus on preventing the escape of malaria infected mosquitoes. As far as is known, there are no mosquito populations able to transmit the above-mentioned NHP malaria parasites in The Netherlands.

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. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

In the event in which skin or liver biopsies will be carries out, appropriate analgesia will be applied.
It is not expected that vaccination and challenge will provide discomfort to the animals. In our experience, even when vaccination and/or challenge are performed using mosquito bites, the animals are not suffering discomfort. However, animals are continuously observed if signs of mild discomfort due to e.g. itching or irritation are detected e.g. after vaccination and/or challenge happen via mosquito bite, appropriate treatment e.g. creams against itching will be applied to the affected body part of the monkey in such cases.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Discomfort by recovery from the sedation.
Reaction to vaccination or adjunct therapy
Mild to moderate malaria symptoms can occur. Short fever spikes, anaemia as mentioned, whether or not accompanied by a lack of appetite and / or reduced activity. These symptoms occur only at higher parasitemias and for a short period when parasites burst from infected red blood cells.

Explain why these effects may emerge.

Awakening from sedation can cause disorientation and nausea

When the blood stage parasite multiplies, it ruptures the red blood cell to invade a new one. This rupture causes toxic chemicals to be released in the blood stream, which can lead to mild malaria symptoms (fever, anaemia).

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

16 hours before sedation animals will have to fasten, to avoid that animals start vomiting on waking up from the sedation.

In general, the symptoms of malaria in most NHP species are very mild at low parasitemia and are therefore hardly observed. Very mild malaria symptoms disappear spontaneously after a few hours, when the red blood cell rupture is over. If animals develop more severe symptoms, the parasitemia is immediately determined and if the parasitemia appears to be exceptionally high (>15%), the animals are immediately cured with chloroquine injections or if the scope of the protocol foresees it, sacrificed. Vit B and iron supplements will be administered i.m. to help the animals recover from anaemia when required.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

☐ No > Continue with question K.

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

If an animal unexpectedly becomes severely sick with an extremely high parasitemia that cannot be treated on time, this will be considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

Mild discomfort for most parasite donors and most animals in therapy testing (ca. 50% of the animals); moderate discomfort (ca. 50% of the animals), if many pricks in the upper leg are required e.g. to study *in vivo* growth, monitor parasitemia during parasite-host interaction studies, or the malaria symptoms are more serious than expected.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

In studies (70%) in which it is necessary to look at the tissue (e.g. liver, spleen, lymph nodes, bone-marrow) immune responses, which cannot be looked at in humans and which are thought to critically contribute to a protective effect against malaria, the euthanasia will take place on fixed endpoint unless human endpoints are reached beforehand. 30% of animals will be cured and return to the experimental stock.

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

[redacted]

5

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: Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in marmoset models relevant to human malaria

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.

Simian parasite-NHP combinations are the species of choice to conduct these studies because the immune system in NHP is closely related to that of humans and the infection of non-human primates with simian parasites best reflects the different aspects of human disease. The use of NHPs in a controlled environment, infected with one parasite at a time as models for malaria infection, gives a unique opportunity to study the interplay between genetic background, host immune reactions and parasite virulence. In this context, the animal colony of at the institute in which the research is going to be carried out has several advantages: animals can be typed for immune markers (e.g. MHC, etc.) and the colony is outbred and thus better represents the large variation of human population.

The marmoset malaria model is less characterized than are the macaque models, the first step will therefore be to better characterize the model during the course of specific parasite-host interaction studies. Vaccine and adjunct therapy studies will only be carried out in this model when the model has been fully characterized and when the target parasite or the specific disease presentation cannot be assessed in macaques. Whenever vaccines or adjunct therapies are tested in this model the criteria set forth in appendix 1A will be strictly followed.

In studies of malaria parasite-host interactions the primary outcome will depend on the purpose of the study in question e.g. correlates of immunity, biomarkers of protection, susceptibility or disease course.

However, the marmoset has added value on several levels: 1. Some parasites cannot be modelled in macaques but can be modelled in marmosets (e.g. *P. brasilianum*, which is an excellent model for the *P.*

malariae human malaria); 2. marmosets, as humans, are naturally differentially susceptible to malaria infection e.g with the human zoonotic parasite *P. knowlesi*; 3. due to the small size marmosets are suitable for bioimaging; 4. marmosets give birth to naturally occurring bone-marrow chimeric twins (hematopoietic mosaicism derived from placenta sharing during gestation), which are ideal to study the immune system's response to disease e.g. study of T and B cell-mediated responses and 5. marmosets give rise to a variable disease presentation that mimics several aspects of disease in humans.

The differences in susceptibility accounts for the need to have larger groups in these parasite-host interaction studies to ensure the statistical significance of results (in our experience 8 to 12 animals per group need to be used). Donor animals may be needed e.g. for *ex vivo* mosquito feeding or when experimental animals need to be infected with an NHP-passaged stock.

In terms of phases, we have a first phase during which parasite-host interactions will be studied in the marmoset with an eye to the in-depth characterization of the model. In this phase it may be necessary to use donor animals e.g. when infections with sporozoites need to be carried out to characterize the parasite-host interaction during the exoerythrocytic stage of infection. Only after an in-depth characterization of the model has been obtained, a next phase will ensue in which in which studies of therapeutics are carried out in the marmoset-parasite model. This model will only be used for such studies if the target parasite or the specific disease presentation cannot be assessed in macaques.

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

In the case of a study aimed at the evaluation of a vaccine and vaccine strategy, the administration of the vaccine/adjunct therapy will take place before the challenge with a specific malaria parasite or parasite strain. The length of this phase depends on the vaccination strategy e.g. primary immunization only, primary immunization followed by several booster vaccinations, vaccine administration under chemoprophylaxis or other. Typically, the length of this phase is between 12 and 28 weeks.

Vaccines can be administered through a number of different routes (intradermal, subcutaneous, intravenous, intramuscular, mosquito bites etc.) and with a frequency that strictly depends on the type of substance e.g. its half-life, solubility, formulation.

Parasite infections (e.g. study of parasite-host interactions; challenge during a vaccine study) are performed under sedation through direct intravenous, subcutaneous or intradermal injections; mosquito bites can also be used to better mimic the field situation. The choice of a specific parasite infection route strictly depends on the purpose of the experiments and the questions at hand. In parasite-host interaction studies the type of parasite-host combination chosen will determine the nature of the infection. The nature of infection is a primary parameter in the study of disease presentation, disease mechanisms and disease progression; immunity to malaria; biomarkers of susceptibility, protection, immune correlates. A specific parasite-host combination is chosen based on the purpose of the experiment, the experimental question to be answered, the relevance of the model for human disease. The model chosen in turn influences the frequency with which specific biotechnical procedures need to be carried out including e.g. the type of drug treatment that needs to be applied at the end of the experiment to cure the animals

Small blood draws are carried out through a needle prick in the thigh of an infected animal e.g. to monitor the parasitemia.

Larger bleedings are always performed under sedation e.g. to measure clinical chemistry and hematology parameters, to isolate immune cells to perform immunological assays, for 'omics studies etc. The frequency of larger bleedings depends on the purpose of the experiment. In general, blood volumes to be taken will not exceed a maximum of 1% of the body weight per 4 weeks (and 0.7% max per bleeding).

Treatment of blood stage malaria is performed through i.m. injections with antimalarial drugs. If a monkey is infected with sporozoites of a NHP malaria species that forms hypnozoites, the monkey will receive the standard radical treatment comprising anti-blood stage drugs (i.m. injections) and specific anti-liver stage drugs (oral administration). Animals are trained to cooperate with procedures such as i.m. administrations, oral administration and small blood draws through positive reinforcement training.

In studies in which it is necessary to look at the tissue (e.g. liver, spleen, lymph nodes, bone-marrow) immune responses (which cannot be looked at in humans), which are thought to critically contribute to a protective effect against malaria, the euthanasia will take place on fixed endpoint unless human endpoints are reached beforehand (which is unlikely to be the case).

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

The first studies in this model will be parasite-host interactions studies. Such studies are exploratory in nature. The primary outcomes will depend on the purpose of the study in question e.g. correlates of immunity, biomarkers of protection or disease course. Thus, the groups size will be determined based on the questions to be answered and based on previous experience. The testing of vaccines and/or adjunct therapies will be limited to specific cases in which they cannot be assessed in macaques.
The primary outcome parameter in vaccine studies is the level of protection from malaria after homologous and/or heterologous challenge. In the best-case scenario, a vaccine or vaccine strategy is able to provide the subject with long-term (ideally: life-long) sterile protection. In the best-case scenario, an adjunct therapy is able to prevent a specific disease manifestation, a complication or the disease as a whole. The number of animals will be restricted to the minimum necessary to obtain statistically significant data. Each study will be preceded by a thorough statistical analysis to determine the minimum number of animals per group necessary to achieve the aims of each study. In parasite-host interaction studies this may include, but is not limited to, the use of a priori sample size algorithms for multiple regression, that are able to estimate sample-size and power in R by exploring simulated study outcomes; in vaccine power studies different statistical methods can be applied depending on the scope of the study such as Fisher's exact test; Kaplan-Meier survival curves tested with log-rank tests; parasitemia courses over time can be modelled using non-linear mixed effects models (NLME). An increased knowledge of the specific mechanisms underlying the illness and the immune response gained through the study of parasite-host interactions can also be used in the future for training in silico prediction models that would reduce the number of animals used in vaccine experiments and refine such experiments. Whenever possible control groups and donor monkeys will be combined between studies.

B. The animals

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

Callithrix jacchus (adult; female and male). Estimated number of animals: ca. 48 animals over a total of 5 years (8-12 animals per group, anticipated number of studies = 4):

The parasite-host combination chosen each time will be the best one for the purpose of the experiment. Experimental models of the two most important human malarias (*P. falciparum* and *P. vivax*) are limited to chimpanzees (that are not used as models any longer), *Aotus* en *Saimiri* monkeys. The parasites must be adapted to these monkeys and most of the time it is necessary to splenectomize such animals to obtain blood stage infection with these parasites. Due to these restrictions and to the very limited availability of these monkey species for biomedical research, these models are rarely used, however valuable they may be. *P. ovale* and *P. malariae* suffer from the same limitations in terms of available models, while *P. knowlesi* (which is a zoonosis) infection can more easily be modeled e.g. in macaques or marmosets. Vaccine studies under this proposal will in general be carried out using the well-established standard models *P. knowlesi*-rhesus macaque as a proxy for *P. falciparum* human malaria and *P. cynomolgi*-rhesus macaque as a proxy for *P. vivax or P. ovale* human malaria. Only on rare occasions when the macaque models will not serve the purpose, we will opt for the marmoset as a model for specific parasite-host combinations (e.g. evaluation of therapies against *P. malariae* human malaria). In this context (as explained in detail above), marmosets have a special place as the modeling of malaria in marmosets is expected to provide complementary insights into the workings of the immune system (bone marrow chimeras), into specific human disease presentations, into the differential susceptibility to malaria and into specific parasites that are good models for human malaria species but cannot be studied in Rhesus macaques.
Overall, parasite-host interaction will be evaluated in the model that is best suited to answer the questions at hand e.g. on the mechanisms behind a specific malaria disease presentation, on specific aspects of the immunity to malaria, on specific aspects of the interplay between genetic background, parasite virulence and host immune system etc.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals to be used in these experiments, may have been used in other studies. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal frameworks described in art. 1[e] of the law on animal testing.

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

☒No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement. No *in vitro* system exists to date that can reproduce the complexity of an organism's immune system. These experiments need to be performed in live animals, because we need to investigate the reaction to vaccination and challenge of the different soluble and tissue components of the immune system to determine the safety and efficacy of vaccines, vaccine strategies and adjunct therapies. In this context, we will test radical new thinking and immunological models with major application for vaccine efficacy/failure; and conduct parasite-host interaction research aimed at uncovering the immune responses conferring protective immunity to malaria; the mechanisms behind the variable susceptibility to malaria resulting in different disease presentations; biomarkers of protection, disease progression and complications and correlates of immunity for malaria vaccines. Ultimately, the combination of these insights will lead to the rational design of better therapies for malaria. Whenever new vaccines are being tested in non-human primates, preliminary rodent experiments have been conducted to test safety, immunogenicity and efficacy. As a next step, we use the non-human primate malaria models, as the immune system of the non-human primate and of humans has great similarity in the response to malaria infection. To answer some of the questions underlying vaccine efficacy and vaccine failure, as well as to conduct research into correlates of protection, rodent models are inadequate, as we need a host that is as closely related to humans as possible. Adjunct therapies and vaccines strategies are also testing in mice or experimental models of human malaria, but limitation in the insights that can be obtained using these models (e.g. no tissue sampling in humans, although the bulk of the protective immune response to malaria happens in the tissues; absence of rodent models that reproduce specific human disease presentations etc.).

Reduction. The donor monkeys are used efficiently in that in transmission experiments, we are feeding the maximum number of mosquitoes, which we can handle in each experiment (1000-1500), to yield large numbers of sporozoites for further studies. Efficient use will be made of infected blood harvested from donor monkeys (e.g. immunological, 'omics, parasitological studies will be carried out), thus reducing the number of monkeys needed for infection.
Whenever possible, donor monkeys and control groups will be combined between experiments.
Prior to vaccine and adjunct therapy studies as well we prior to parasite-host interaction studies, the minimum number of animals required to obtain significant results will be determined using appropriate statistical methods. The statistical method may vary depending on the type and scope of the experiment and will be specified in the IvD protocol.

Refinement. The blood-stage parasitemia of NHP-parasites in marmoset is reasonably predictable, both in the case of blood stage and sporozoite infections. Through this knowledge we can restrict the needed thigh pricks to a minimum (in any case in parasite infections that have been used in marmosets before). For "uncharacterized" parasites the parasitemia development may be less predictable, but in such cases, we plan thigh pricks strategically around periods in which parasites are being expected to reduce the discomfort for the animals, while being able to follow the parasitemia development accurately nonetheless. Moreover, we are using trained animals (positive reinforcement training), which voluntarily

offer their thigh for a prick, after which they receive a reward. This reduces the stress for the animals. The mosquito feedings on sporozoite donors are performed *ex vivo*, so that the animals do not suffer from the mosquito bites. After infection, the animals are scored daily to assess clinical symptoms by using a clinical scoring list. Appropriate human endpoints will be in place to prevent animal suffering in unforeseen circumstances.

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

The malaria infection itself gives mild malaria symptoms (at higher parasitemia), as for example fever, anaemia, decreased appetite and reduced activity when the parasite ruptures from the infected red blood cell. Animal caretakers check the animals on a daily basis and warn the researcher when needed. The development of the infection is closely watched and the infection is immediately cured if the above-described symptoms of infection worsen or continue for more than half a day. Human endpoints are determined beforehand to limit the discomfort in unforeseen circumstances. The use of trained animals, as described above, reduces the stress the animals experience during handling.

Environmental effects. NHP parasites are class 2 organisms and experiments with these parasites are carried out under containment level 2. Infected mosquitoes are handled in a specially equipped mosquito laboratory, where the work protocols focus on preventing the escape of malaria infected mosquitoes. As far as is known, there are no mosquito populations able to transmit the above-mentioned NHP malaria parasites in The Netherlands.

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. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

In general, vaccine studies in the marmoset will be the exception and it is not expected that vaccination and challenge will provide discomfort to the animals. In our experience, even when vaccination and/or challenge are performed using mosquito bites, the animals are not suffering discomfort. However, animals are continuously observed if signs of mild discomfort due to e.g. itching or irritation are detected e.g. after vaccination and/or challenge happen via mosquito bite, appropriate treatment e.g. creams against itching will be applied to the affected body part of the monkey in such cases.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Discomfort during sedation by recovery from the sedation.
Reaction to vaccination
Mild to moderate malaria symptoms can occur. Short fever spikes, anaemia as mentioned, whether or not accompanied by a lack of appetite and / or reduced activity. These symptoms occur only at higher parasitemias and for a short period when parasites burst from infected red blood cells.

Explain why these effects may emerge.

The animals can experience hypothermia during sedation
Awakening from sedation can cause disorientation and nausea

When the blood stage parasite multiplies, it ruptures the red blood cell to invade a new one. This rupture causes toxic chemicals to be released in the blood stream, which can lead to mild malaria symptoms (fever, anaemia).

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

Hypothermia will be averted through the use of heating devices e.g. heat mats.
16 hours before sedation animals will have to fasten, to avoid that animals start vomiting on waking up from the sedation.

In general, the symptoms of malaria in most NHP species are very mild at low parasitemia and are therefore hardly observed. Very mild malaria symptoms disappear spontaneously after a few hours, when the red blood cell rupture is over. If animals develop more severe symptoms, the parasitemia is immediately determined and if the parasitemia appears to be exceptionally high (>15%), the animals are immediately cured with chloroquine injections or if the scope of the protocol foresees it, sacrificed. Vit B and iron supplements will be administered i.m. to help the animals recover from anaemia when required.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

☐ No > Continue with question K.

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

If an animal unexpectedly becomes severely sick with an extremely high parasitemia that cannot be treated on time, this will be considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

Mild discomfort for most parasite donors and most animals in therapy testing (ca. 20% of the animals); moderate discomfort (ca. 80% of the animals)., if many pricks in the upper leg are required e.g. to study

in vivo growth, monitor parasitemia during parasite-host interaction studies, or the malaria symptoms are more serious than expected.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

In studies (80%) in which it is necessary to look at the tissue (e.g. liver, spleen, lymph nodes, bone-marrow) immune responses, which cannot be looked at in humans and which are thought to critically contribute to a protective effect against malaria, the euthanasia will take place on fixed endpoint unless human endpoints are reached beforehand. 20% of animals will be cured and return to the experimental stock.

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: PK/PD studies 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.

If insufficient data are available to establish dose and administration frequency of new treatments in the macaque malaria model, it may sometimes be necessary to determine the pharmacokinetics, pharmacodynamics (PK/PD) and/or optimal administration schedule of a new therapy, prior to testing the efficacy in a malaria study. Only if the criteria for testing new therapies defined in appendix 1 are fulfilled, it will be determined whether PK/PD studies are necessary.

Criteria that can lead to the assessment of PK/PD may include:

- Insufficient data to extrapolate dose and possibly frequency from previous studies, other species, comparable compounds.
- Where possible physiologically based pharmacokinetic modeling will be used to further supplement this data. However, for biologicals this method is not yet available for monkeys. An attempt will be made to develop this
- Small therapeutic index.

The experimental approach will always take the nature of the therapeutic into account.
In PK/PD studies the therapeutic is administered once or repeatedly. In general, the primary outcome is the concentration of the therapeutics in the blood, but in certain cases the purpose of the experiment may require the determination of the concentration of the therapeutics in the tissue. In the course of PD studies, the effects of the therapeutics on indirect parameters such as hematology, blood chemistry, cell

types in the blood, cytokine production and other functional values may also be assessed. In these cases, it may also be important to measure such indirect parameters at the tissue level (e.g. lymphoid organs, liver).

In PK/PD studies it is generally not necessary to include a control group. The values in the blood before the administration of the therapeutic are used as baseline (internal control). Only if the type of expected effects is such as to suggest effects e.g. on specific tissues, it may be necessary to include a control group. In most cases, the animals will be alive at the end of the study.

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

The route of administration of a test substance is determined per study and depends on the nature of the test substance. Administration of the test substance may require sedation in cases in which a gavage is used in combination with an oral regimen or in which intravenous, subcutaneous, intradermal or intramuscular injections are used. Animals can be trained to cooperate if an oral administration does not require gavage and in cases of intramuscular administration.

Blood will be taken regularly after the administration. In the case of PK, these can be multiple small blood samples in a relatively short period of time after the first injection. In the case of pharmacodynamics, where the effect of the candidate drug on biological / immunological processes is determined, larger blood volumes may be required. The total amount of blood collected will not exceed the maximum established within the institute of 1% of the body weight per 4 weeks (and 0.7% max per bleeding).

If it is necessary (< 10% of cases) to measure the presence or effects of the new drug candidate in the tissues e.g. lymphoid organs, liver, the animals will be euthanized.

In some cases, the malaria infection can affect the PK/PD of specific therapeutics, thus requiring the PK/PD study to be carried out on infected animals. When such studies are necessary it may be possible also to assess some initial effect of the therapeutic on the parasite infection. Animals will be infected with the most appropriate simian parasite determined by the scope of the study i.v. or by mosquito bite under sedation. The acquired knowledge on the effect of the therapeutic on the parasite infection may be used to reduce the number of animals needed in a proper assessment of the therapeutic described in appendix 1. If parasitemia is an additional outcome of the study, animals will be trained to voluntarily participate in thigh prick procedures (small blood volumes). Treatment of blood stage malaria is performed through i.m. injections with antimalarial drugs. If a monkey is infected with sporozoites of a NHP malaria species that forms hypnozoites, the monkey will receive the standard radical treatment comprising anti-blood stage drugs (i.m. injections) and specific anti-liver stage drugs (oral administration). Animals are trained to cooperate with procedures such as i.m. administrations, oral administration and small blood draws through positive reinforcement training.

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

In a PK and / or PD experiment, in most cases each animal is its own control. Statistical testing takes place by comparing a parameter (usually the amount of test substance in the blood) before and after treatment. The size of a test group is not determined by power analysis but based on experiences from previous studies with a similar therapy. A test group will usually consist of a limited number of animals (n = 2-4 per group), because PK profiles are consistent and usually not very different between individual animals. It is an experience from previous studies that such a limited group size is sufficient. The effect of a therapy on biological processes (PD) comprises several variables and therefore requires a group size of 3 to 5 animals, depending on the nature of the therapy / therapeutic and the outcome parameters. The spread between animals in the time to primary parasitemia in our experience is very limited: all animals are positive within 2-4 days. If several doses and / or administration routes per drug are tested in the same experiment, often 2 animals per group will suffice. The number of animals per group will be submitted to the IvD for approval per study.

B. The animals

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

Rhesus monkeys (*Macaca mulatta)*, adult, male and female. These animals will be used in the PK/PD studies. The specific parasite used will depend on the therapeutic to be tested e.g. models of specific disease presentations will be used depending on the expected mechanism of action of the therapeutic. A maximum of 15 animals will be used in 5 years for PK/PD studies. The animals will be coming from the institute's own colony.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals to be used in these experiments, may have been used in other studies. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal frameworks described in art. 1e of the law on animal testing.

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

☒No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement. The pharmacokinetics and / or pharmacodynamics are specific for the animal species. If the necessity of testing the efficacy of a new therapeutic in macaques has been established, then it follows automatically from the need to test any pharmacokinetics and / or dynamics in the same animal species. Replacement by a less complex animal species is not relevant in that case.
Physiologically based pharmacokinetic modeling will be applied where possible. This method has not yet been developed for adjunct therapies, such as monoclonal antibodies, cytokines and the like. In collaboration with other units at the institute an attempt will be made to develop this methodology (application is likely to be premature within the timeframe of this project). In the case of biologicals or small molecules that interfere with a specific cascade of the host e.g. sequestration cascade, prior to the PK/PD experiment, it will be explicitly established whether there is cross-reactivity and / or efficacy in this type of test using animal-free *in vitro* methods. Similarly, such assays will be used where necessary for quality control of the candidate drugs.

Reduction. A limited number of animals are used in PK/PD studies and contribute directly to reducing the number of animals in macaque studies of efficacy.

Refinement. We always strive to achieving the best possible PK/PD analysis, while taking the minimum amounts of blood at as few time points as possible. The blood-stage parasitemia of NHP-parasites in rhesus monkeys is reasonably predictable, both in the case of blood stage and sporozoite infections. Through this knowledge, in PD studies, we can restrict the needed thigh pricks to a minimum (in any case in parasite infections that have been used in rhesus monkeys before). Moreover, we are using trained animals (positive reinforcement training), which voluntarily offer their thigh for a prick, after which they receive a reward. This reduces the stress for the animals.

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

The malaria infection itself may give mild malaria symptoms (at higher parasitemia), as for example fever, anaemia, decreased appetite and reduced activity when the parasite ruptures from the infected red blood cell. Animal caretakers check the animals on a daily basis and warn the researcher when needed. The development of the infection is closely monitored and the infection is immediately cured if the above-described symptoms of infection worsen or continue for more than half a day. Human

endpoints are determined beforehand to limit the discomfort in unforeseen circumstances. The use of trained animals, as described above, reduces the stress the animals experience during handling.

Environmental effects. Malaria parasites are class 2 organisms and experiments with such parasites are carried out under containment level 2 (DMII and MLII).

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. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☒ No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1>Discomfort from the awakening from sedation
2>Discomfort from frequent fasting
3> PD studies in infected animals: Discomfort from mild malaria symptoms (fever, anaemia)

Explain why these effects may emerge.

1>Awakening from sedation can cause nausea and disorientation
2> Supplementary nutritious and high calorie diet is administered (via esophagus tube) during the period of frequent (daily) fasting.
3> Mild malaria symptoms (fever, anaemia) may occur when the parasites burst out of the red blood cells during the multiplication, in order to infect new red blood cells, as toxic substances are released into the blood that lead to these symptoms.

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

16 hours before sedation animals will have to fasten, to avoid that animals start vomiting on waking up from the sedation.

In general, the symptoms of malaria in most NHP species are very mild at low parasitemia and are therefore hardly observed. Very mild malaria symptoms disappear spontaneously after a few hours, when the red blood cell rupture is over. If animals develop more severe symptoms, the parasitemia is immediately determined and if the parasitemia appears to be exceptionally high (>15%), the animals are immediately cured with chloroquine injections or if the scope of the protocol foresees it, sacrificed. Vit B and iron supplements will be administered i.m. to help the animals recover from anaemia when required.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

☐ No > Continue with question K.

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

If an animal unexpectedly becomes severely sick with an extremely high parasitemia that cannot be treated on time, this will be considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative discomfort is classified as moderate. The discomfort is mainly determined by the recovery from anesthesia after the blood tests. If the number of anesthesias is limited, the distress can be estimated as light if necessary. This will be done in consultation with the IvD.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

In some cases, the animals will be sacrificed at the end of a study in order to be able to investigate the biological response to the test substance in tissues e.g. lymphoid organs, liver.

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

8

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020186346

Datum 26 oktober 2018
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e ,

Op 30 augustus 2018 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development" met aanvraagnummer AVD5020020186346. 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:

Onduidelijkheden
De CCD heeft recent 2 vergunningen afgegeven voor onderzoek naar malaria bij dezelfde instellingsvergunninghouder. In vergunning AVD5020020185886 worden apen gebruikt voor het verkrijgen van parasieten voor studies naar geneesmiddelen en vaccins voor malaria. In de huidige aanvraag worden hier echter ook dieren aangevraagd. In vergunning AVD5020020172664 wordt onderzoek gedaan naar nieuwe medicijnen voor malaria. In deze huidige aanvraag wordt dit ook als doel genoemd.
Het is niet duidelijk of er overlap is tussen de verschillende studies. U wordt verzocht dit toe te lichten.

In de aanvraag wordt aangegeven dat het marmoset model nog geoptimaliseerd moet worden. Uit de aanvraag wordt niet duidelijk of daarvoor binnen de huidige aanvraag dieren moeten worden gebruikt, zo ja welke proeven daarvoor worden uitgevoerd en welke criteria gehanteerd

worden voordat de marmosets daadwerkelijk gebruikt worden. U wordt verzocht dit toe te lichten.
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. 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

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: AVD5020020186346

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:
26 oktober 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020186346

3 Ondertekening

Naam: .....

Datum: ..... - ..... - .....

Handtekening: .....

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag

9

BPRC

Centrale Commissie Dierproeven
10.2.e
Postbus 93118
2509AC Den Haag

P.O. Box 3306
2280 GH Rijswijk
The Netherlands
1
www.bprc.nl

Date October 30, 2018 Our ref. 10.2. Your letter ☎ 10.2.e ✉ 10.2.e

Subject projectvergunningaanvraag AVD5020020186346

Geachte 10.2.e

Met betrekking tot projectvergunning aanvraag AVD 5020020186346 met de titel " Study of parasite host-interactions and efficacy of new treatment methods in non-human primate malaria models relevant to human malaria infection" heeft de CCD nog enkele vragen gesteld ter verduidelijking van de aanvraag. Abusievelijk staat dit project in de CCD correspondentie vermeld als "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development", wat de titel is van de toegekende projectvergunning AVD 5020020185886. Hierdoor is mogelijk verwarring ontstaan.

Hieronder vind u onze antwoorden op de twee gestelde vragen:

Vraag 1: *De CCD heeft recent 2 vergunningen afgegeven voor onderzoek naar malaria bij dezelfde instellingsvergunninghouder. In vergunning AVD5020020185886 worden apen gebruikt voor het verkrijgen van parasieten voor studies naar geneesmiddelen en vaccins voor malaria. In de huidige aanvraag worden hier echter ook dieren aangevraagd. In vergunning AVD5020020172664 wordt onderzoek gedaan naar nieuwe medicijnen voor malaria. In deze huidige aanvraag wordt dit ook als doel genoemd. Het is niet duidelijk of er overlap is tussen de verschillende studies. U wordt verzocht dit toe te lichten.*

De huidige aanvraag betreft studies naar parasiet-gastheer interacties en het ontwikkelen van vaccins en gastheer-gerichte therapie. Omdat dit complexe interacties betreft is hiervoor een intact immuunsysteem nodig. De twee eerdere projectvergunningen betreffen 2 andere vraagstellingen.

Aanvraag AVD5020020182664 ("Plasmodium cynomolgi als model voor P. vivax malaria voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia") betreft het onderzoek naar medicijnen specifiek voor leverstadia en de bestudering van de biologie van de parasiet tijdens deze leverstadia. Dit richt zich in tegenstelling tot de aanvraag AVD5020020186346 niet op het bestuderen

BPRC is a registered foundation. The Standard Conditions for Research Studies carried out by BPRC shall apply. As registered under nr. 89/1995 of the District Court in The Hague and under nr. 41146967 of the Chamber of Commerce in The Hague. Bank: ABN AMRO, P.O. Box 300, 2600 AH Delft, BIC code: ABNA NL 2A, IBAN code: NL 87 ABNA 0515544779

van het immuunsysteem gedurende de leverstadiuminfectie noch het testen en/of het ontwikkelen van vaccins of gastheergerichte/immuun therapie. AVD5020020185886 ("Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development ") heeft als doelstelling het verkrijgen van parasietmateriaal dat niet via *in vitro* cultuur verkregen kan worden. Dit materiaal wordt gebruikt voor het vergroten van de kennis van de biologie van de parasieten en het identificeren van nieuwe aangrijpingspunten voor therapie. De hieruit verkregen kennis over de parasiet kan uiteindelijk hopelijk gebruikt worden om gerichter medicijnen en vaccins tegen de menselijke malariavarianten te ontwikkelen. Daarnaast wordt getracht om deze parasieten zodanig te adapteren dat ze in *in vitro* kweken kunnen groeien, zodat we hiervoor in de toekomst hopelijk minder *in vivo* studies nodig hebben. Deze studie is dus alleen gericht op de parasiet en bestudeerd geen gastheer-parasiet interacties.

Vraag 2: In de aanvraag wordt aangegeven dat het marmoset model nog geoptimaliseerd moet worden. Uit de aanvraag wordt niet duidelijk of daarvoor binnen de huidige aanvraag dieren moeten worden gebruikt, zo ja welke proeven daarvoor worden uitgevoerd en welke criteria gehanteerd worden voordat de marmosets daadwerkelijk gebruikt worden. U wordt verzocht dit toe te lichten.

Optimalisatie van het marmoset model maakt inderdaad deel uit van de huidige aanvraag en wordt als onderdeel van de studie van parasiet-gastheer interacties beschouwd omdat wij tijdens de volledige karakterisering van het marmoset model naar het verloop van de infectie inclusief parasitemie, ziektemanifestatie en ziekteprogressie kijken en de verschijnselen onderzoeken in pathologische en immunologische termen. De studies in marmosets zijn daarom ook gefaseerd.

In de eerste fase zullen parasiet-gastheer interacties worden bestudeerd in de marmoset met het oog op de grondige karakterisering van het model. In deze fase kan het nodig zijn om donordieren te gebruiken, bijvoorbeeld wanneer infecties met sporozoïeten moeten worden uitgevoerd om de interactie tussen parasiet en gastheer tijdens alle fases van de infectie te karakteriseren.

Pas nadat een grondige karakterisering van de parasiet-gastheer interacties in dit model is verkregen, volgt een volgende fase waarin studies met therapeutica worden uitgevoerd in het marmoset-parasietmodel. Dit model zal alleen voor dergelijke onderzoeken naar therapeutica worden gebruikt als de doelparasiet of de specifieke aandoening niet kan worden beoordeeld in makaken.

Alhoewel we meestal makaken zullen gebruiken heeft de marmoset op verschillende niveaus een toegevoegde waarde: 1. Sommige belangrijke parasieten kunnen niet worden gemodelleerd in makaken, maar kunnen worden gemodelleerd in marmosets (bijvoorbeeld *P. brasilianum*, dat een uitstekend model is voor de humane *P. malariae* parasiet); 2. In tegenstelling tot makaken zijn marmosets, net als mensen, van nature differentieel vatbaar voor bepaalde malaria-infecties, bijvoorbeeld voor de menselijke zoönotische parasiet *P. knowlesi*; 3. marmosets geven geboorte aan van nature voorkomende beenmerg-chimere tweelingen, die ideaal zijn om de reactie van het immuunsysteem op ziekte te bestuderen, b.v. studie van T- en B-cel-gemedieerde responsen en 4.

marmosets geven aanleiding tot een variabele ziektebeeld die verschillende unieke aspecten, zoals sequestratie van rode bloedcellen, van de humane ziekte nabootst.

De verschillende malaria modellen in makaken en marmosets zijn complementair en dragen bij aan de kennis van de modulatie van het immuunsysteem door de parasieten en ontwikkeling van nieuwe preventie door vaccins of nieuwe interventies middels gastheer-gerichte therapie.

Met vriendelijke groet 10.2.g

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven

10

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	10.2.g
		Telefoonnummer	10.2.e
		E-mailadres	10.2.e
1.5	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e X Dhr. ☐ Mw.
		Functie	Afdelingshoofd
		Afdeling	10.2.g
		Telefoonnummer	10.2.e
		E-mailadres	10.2.g

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?	X Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*	
		☐ 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	
		X Nee > Ga verder met vraag 3	
2.3	Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	X 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 - 11 - 2018
		Einddatum	31 - 10 - 2023
3.2	Wat is de titel van het project?	Study of parasite host-interactions and efficacy of new treatment methods in non-human primate malaria models relevant to human malaria infection	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Bestudering van ziektemechanismen en de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes in niet-menselijke primaten modellen van humane malaria infecties	
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	10.2.g
		E-mailadres	10.2.g

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	☐ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 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

☐

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	- - 2015
Handtekening	

Centrale Commissie Dierproeven

11

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.	Study of parasite host-interactions and efficacy of new treatment methods in non-human primate malaria models relevant to human malaria infection.

2 Categories

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

- ☒ Basic research
- ☒ Translational or applied research
- ☐ Regulatory use or routine production
- ☐ Research into environmental protection in the interest of human or
- ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- ☐ Higher education or training
- ☐ Forensic enquiries
- ☐ Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Malaria is one of the most important human infectious diseases, affecting particularly the poorest populations living in the tropical and the sub-tropical areas of the world. Malaria is a serious disease, deaths

are a consequence of a series of complications termed severe malaria and of treatment failure. The high mortality combined with an even higher burden of disease, known as morbidity, is hampering the socio-economic development of developing countries. Yearly around 660,000 people die of malaria, the majority of which are children younger than 5 years of age, pregnant women, the elderly and immunocompromised adults. Overall 3,2 billion people in 95 countries are at risk of malaria infection. A vaccine able to provide sterile protection from infection does not exist and the parasite is becoming resistant to drugs very quickly leading to an increasing level of treatment failure. Given the seriousness of the threat that malaria poses, effective vaccines and drugs are urgently needed (1).

Malaria is caused by parasites of the genus *Plasmodium*, which are transmitted to their vertebrate host through *Anopheles* mosquitoes. After a mosquito bite the parasite stages known as sporozoites travel first to the liver where they multiply for six to ten days (figure 1). The liver phase of the infection is asymptomatic. When the infected liver cells burst, around 10.000-40.000 new parasites are released into the blood stream, which infect red blood cells and can multiply up to ± 10-fold. Some malaria parasite species, aside from producing developing liver stages, give also rise to sleeping liver stages, which do not develop in a first instance, but stay quiescent in the liver for a variable amount of time before reactivation. Such liver forms are known as hypnozoites. The blood stage of the malaria infection is responsible for the symptoms of disease. During this phase of infection also sexual blood stages (gametocytes) of the parasite are formed, which are ingested by the mosquito with the following blood meal. In the mosquito, female and male gametocytes combine to form the zygote (the fertile parasite stage), which gives rise to a new generation of sporozoites that travel to the salivary glands of the mosquito from where they are transmitted again to a vertebrate host during the next blood meal thus perpetuating the cycle of transmission and disease.

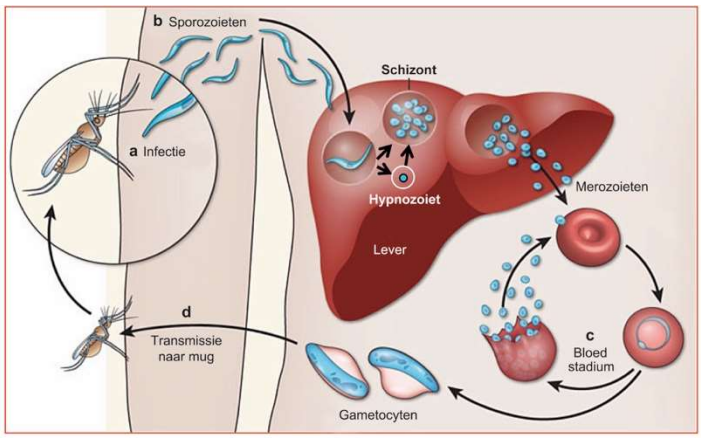

Figure 1. The life cycle of the malaria parasite. Sporozoites are transmitted from a mosquito to a vertebrate host and travel to the liver. Hypnozoites in the liver are only formed by *P. vivax*, *P. ovale* (human malarias), and a limited number of non-human primate malaria parasites. Merozoites leave the liver to enter the blood stream and infect red blood cells, in which they multiply at every cycle. In the blood they also form sexual stages (gametocytes), that are transmitted from the host to the mosquito during the next blood meal, thus perpetuating the cycle of transmission and infection.

There are five *Plasmodium* species that infect humans: *P. falciparum*, *P. vivax, P. malariae, P. ovale and P. knowlesi*. Of these species *P. falciparum* and *P. vivax* are the most widespread. *P. falciparum* is responsible for the high malaria mortality, while *P. vivax* is responsible for the high malaria burden of disease (morbidity) as it gives rise to a more chronic form of malaria brought about by the re-activation of hypnozoites. Two human parasites (*P. vivax, P. ovale*) are able to form hypnozoites, which can reactivate weeks, months or even years after the primary infection giving rise to malaria anew, without exposure to a new infection. On the other hand, *P. falciparum*, *P. malariae* and *P. knowlesi* infections in humans do not give rise to sleeping liver stages but can be responsible for extremely serious complications leading to death. *P. falciparum* is geographically distributed in the tropical and sub-tropical areas of Central and South America, Sub-Saharan Africa and South-East Asia. Areas in which *P. falciparum* is distributed are characterized as unstable or stable depending on parasite incidence. *P. vivax* is found in the sub-tropical areas of Central and South America, India and South-East Asia, but has recently been re-emerging also in Sub-Saharan Africa. *P. falciparum* and *P. vivax* co-infections are observed in areas where the two overlap, but are poorly characterized as in the field the priority is mostly immediate treatment.

Individuals have been found to be differentially susceptible to the infection (2), which is thought to cause the heterogeneity in disease presentation ranging from asymptomatic to mild, from chronic to severe. This heterogeneity is a hallmark of malaria and is likely caused by the interplay between genetic background of both host and parasite (including differences between parasite strains), host immune response and parasite virulence. An in-depth understanding of this interplay is key to improving our knowledge of the aetiology and mechanisms of disease, which in turn is essential for the development of vaccines conferring sterile protection and adjunct therapies such as immune therapy or other host directed therapies, to prevent and treat disease complications. While vaccines would be a very cost-effective method to combat malaria, finding a vaccine able to elicit sterile protection in humans has been difficult. Despite 75 years of focused research (in the case of *P. falciparum* malaria) and reports already suggesting in the late 1960's that sterile protection can be elicited in mice using radiation-attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites (3), an effective malaria vaccine has yet to be developed. An ideal vaccine would be: safe; easy to manufacture; easy to administer; cheap; and, when administered in infancy, confer life-long immunity against all forms of the disease.
Many factors make malaria vaccine development challenging (4). First, the parasite changes through several life stages in the human host, presenting a different subset of molecules to the immune system at each stage (4). Second, the parasite has evolved a series of strategies that allow it to confuse, hide, and misdirect the human immune system (4). Third, it is possible to have multiple, simultaneous malaria infections of not only different species but also of different strains, indicating that even the immune response to the live parasite is more complex than is the case with most other infectious diseases. Finally, the size and genetic complexity of the parasite mean that each infection presents thousands of antigens to the human immune system. Understanding which of these can be a useful target for vaccine development has been complicated. Different antigens have been used as targets for vaccination (5) and the institute where this research is going to be carried out has had an in-house vaccine development program for more than 25 years (ref 6 and references therein).

The only subunit vaccine thus far to demonstrate reproducible evidence of low to moderate protection is the GSK (GlaxoSmithKline Vaccines) candidate RTS,S (also known as Mosquirix™) developed in Belgium (7). Although RTS,S is not able to bring about sterile protection it seems to reduce the incidence of cerebral malaria (7). The caveats, complexities, risks and cost implications of this vaccine led experts from the European Medicine Agency to define it as "a complicated vaccine requiring a complicated recommendation" (8), indicating the need for the development of better vaccines.

Clinical development of vaccines against infectious agents is a lengthy and costly process, particularly challenging for those diseases (such as malaria) for which immune responses conferring protective immunity are unknown. In those cases, vaccine candidates have been developed largely by applying trial and error strategies. This requires testing of each vaccine candidate in humans through conducting large controlled clinical trials, subjecting participants to experimental or natural challenge by the pathogen to assess protection (5, 9). The limited success of these strategies in the case of RTS,S / Mosquirix™ (the best vaccine available, to date) has highlighted the need for more research into the mechanisms underlying malaria immunity and pathogenesis. It has become increasingly clear that, while pursuing trial and error approaches is inevitable at present, our continued failure to develop an effective malaria vaccine is partially related to our limited understanding of the immunity to malaria (e.g. immunological memory in malaria, which differs from other infectious diseases), the lack of research into the factors underlying differential susceptibility and the absence of established correlates of protective immunity. Research into the latter has been hampered by the impossibility to look at tissue (e.g. liver, spleen, lymph nodes, bone-marrow) immune responses in humans, which are thought to critically contribute to a protective malaria vaccine effect. In humans, namely, sampling is limited to the blood. Ultimately, it has become clear that this lack of insights hinders the rational design of better therapies for malaria and that the success of a vaccine against malaria hinges on our ability to understand parasite-host interactions defined as the molecular interactions between the malaria parasite and the immune system of the patient, which result from the interplay between the genetic background of both host and parasite strain, host immune response and parasite virulence.

Plasmodium parasites have a narrow host preference; there are *Plasmodium* species that infect birds, reptiles, rodents, monkeys and humans. While most *Plasmodium* parasite-host combinations are generally

very specific, most monkey malarias infect also humans and some are important zoonoses. Experimental models of the two most important human malarias (*P. falciparum* and *P. vivax*) are limited to chimpanzees, *Aotus* en *Saimiri* monkeys. The parasites must be adapted to these monkeys and most of the time it is necessary to splenectomize such animals to obtain blood stage infection with these parasites. Due to these restrictions and to the very limited availability of these monkey species for biomedical research, these models are rarely used, however valuable they may be (10). *P. ovale* and *P. malariae* suffer from the same limitations in terms of available models. *P. knowlesi* is a zoonosis that can be modeled in macaques or marmosets.
As human parasites are difficult to study in experimental models and studies in humans are restricted for a variety of ethical reasons, simian parasites in non-human primate (NHP) models offer the most relevant parasite host combinations for the study of human malarias. The modelling of complex pathophysiological events involving the immune system aimed at understanding the regulatory mechanisms underlying the interplay between the parasite and its host in order to design and evaluate adjunct intervention strategies and effective vaccines, cannot be achieved using *in vitro* models and requires intact parasite-host combinations. Such combinations have the added value to allow for insights into combinatorial biomarkers from the lymphoid tissues and other organs (in addition to peripheral blood), which cannot be measured in the human immunization models but where the bulk of the immune response is expected to occur. Simian parasite-NHP combinations are the species of choice to conduct these studies because the immune system in NHP is closely related to that of humans and the infection of non-human primates with simian parasites best reflects the different aspects of human disease. Non-human primate *Plasmodium* infection models have been developed that are relevant for each human host-parasite combination to allow for the study of parasite-host interactions. *P. knowlesi*, *P. coatneyi* and *P. fragile*-NHP combinations are good models for the human *P. falciparum* malaria, *P. brasilianum*-NHP combinations are good models for the human *P. malariae* malaria and *P. simiovale, P. cynomolgi* and *P. fieldi* are good models for the human *P. ovale* and *P. vivax* malaria, respectively. *P. knowlesi* is a zoonosis meaning that the parasites infect both non-human primates (chiefly macaques) and humans. The infection in non-human primates can therefore be used as a model of human malaria. While macaques will be generally used as the standard NHP model species, a limited number of marmosets are also used to model specific aspects of human disease (11). Compared to the macaque, due to the small size of the animal, this model offers the possibility of applying live imaging techniques to the study of host-pathogen interactions.

A high level of heterogeneity (e.g. multiple infections, inter-human differences as to immunological status at infection, large differences in diet, age etc.) characterizes human infections in the field making it very difficult to determine the key factors underlying disease control and disease progression into complications. The use of NHPs in a controlled environment, infected with one parasite at a time, gives a unique opportunity to study the interplay between genetic background, host immune reactions and parasite virulence. This control of infection may be modulated by innate and adaptive immune mechanisms that may be different between the different macaques. The non-human primate population at the institute where this research is going to be carried out is outbred and can therefore better represent the large variation of human population than would an inbred population. Furthermore, the macaque colony at the institute are typed for their Major Histocompatibility Complex (MHC) and Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) thus making it possible to follow KIR phenotypes during the course of the malaria infection. The technology has also been developed to type MHC and KIR cells of marmosets for specific experiments. If rhesus macaques originating from China will be used, they will first be MHC-typed and KIR phenotypes will be determined, then be followed during the experiment as for all other animals. The MHC defines how antigens are processed by the immune system, while the KIR repertoire defines part of the reactions of the native immune system to pathogens. Information on the specific MHC and KIR phenotypes is important in studies of malaria parasite-host interactions as MHC (12) and KIR (13) phenotypes have an influence on the immune response to malaria and thus on the study of disease presentation and mechanisms that are the object of this application. Furthermore, applicability to the human situation is always a question of validation in the specific context in which the specific results of host-pathogen interactions and biomarkers need to be applied.

Malaria is a complex disease that gives rise to many different physio-pathological manifestations in humans. The use of different combinations of parasites and animal hosts will allow us to look at parasite-host interactions that reflect different characteristics of the human disease (asymptomatic all the way through to malaria complications) and in some cases different aspects of the particular disease

presentation (e.g. anaemia). Understanding the parasite-host interaction mechanisms that underpin these different manifestations is essential to target them with the appropriate tools (drugs, vaccines). Using different NHP species and origins (*Macaca mulatta*, *M. fascicularis*, *Callithrix jacchus*) in combination with different NHP malarias, we have unique models that reproduce the different aspects of malaria in humans. In terms of NHP malaria hosts, the rhesus macaque is characterized best, followed by the cynomolgus macaque and the marmoset, the latter being the least characterized at this point. However, these models are expected to provide complementary insights that contribute to the same goal of a better understanding of parasite-host interaction and of the cross-talk between the parasite and the host immune system, which is required in order to develop effective vaccines and adjunct therapies. The marmoset model will only be used for testing vaccines and adjunct therapies after the model has been fully characterized and when the target parasite or the specific disease presentation and only when the therapy cannot be assessed in macaques. For example, a comparison of the in-depth sequencing information gained from the different models, will make it possible for us to uncover variables related to disease susceptibility and differential progression. Also, we will be able to investigate the mechanisms underlying disease susceptibility and progression in terms of critical biological pathways resulting in possible drug targets for therapies.

Although biomarkers for malaria are much needed (2), this is difficult to pursue in patients as these are quickly treated after admission to the hospital/clinic. Human malaria biomarkers research is therefore always done *a posteriori*, trying to interpret a range of heterogeneous data marred by all sorts of confounders. At present, very limited useful insights have emerged from this *a posteriori* approach. The use of a well-characterized model, will allow us to disentangle true malaria host-parasite interactions and biomarkers from the confounders, which are typical of the field situation (underlying conditions, multiple infectious diseases etc.).

At the institute where the study will be carried out there is a lot of experience in working with simian malaria parasite in non-human primates to investigate mechanisms of immunity and pathogenesis that can be exploited for the design of innovative anti-malaria therapies. The institute has conducted an own in-house vaccine development program for ±40 years and had thus a wealth of experience in assessing the safety and immunogenicity of vaccine candidates, evaluating novel vaccination strategies and adjunct therapies. Furthermore, there is a great deal of experience in using 'omics and systems analysis to uncover and validate gene targets for drug and vaccine approaches as well as combinatorial biomarkers.

The applied studies which will be carried out in this framework include:

- The assessment of vaccines and vaccination strategies in NHP parasite-host combinations relevant to human malaria infections;
- The assessment of adjunct therapies for malaria aimed at potentiating the immune system, at interfering with pathways and mechanisms underlying the development of malaria and malaria complications;
- The characterization of parasite-host interactions in specific NHP parasite-host combinations with defined genetic background and/or origin;
- The optimization and refinement of NHP models for human malarias;
- The identification of combinatorial biomarkers for the different stages of illness and surrogate biomarkers of protection, as well as immune correlates;
- Host tissue harvesting for 'omics, immunological and system analysis studies in limited cases in which host-mechanisms underlying parasite-host interactions (e.g. local immunity or inflammatory response in specific organs) needs to be investigated to define combinatorial biomarkers;
- *In vivo* transfection studies of simian parasites, which cannot yet be cultured *in vitro* to validate specific target genes for therapies emerging from 'omics and systems biology studies and the study of *in vitro* manipulated (*P. knowlesi*) parasites *in vivo*.

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, overarching aim of this project is the contribute to the development of vaccines, vaccinations strategies and adjunct therapies (e.g. such as immune therapy and other host-directed therapies) that are able to protect populations living in endemic areas as well as risk groups traveling to countries where malaria is still present.

This ultimate, overarching aim will be achieved through a research strategy that combines the study of parasite-host interactions in NHP parasite-host combinations relevant to human malarias with the direct assessment of novel vaccine candidates, innovative vaccinations strategies and adjunct therapies.

In terms of parasite-host interactions the direct aim of this proposal will be to uncover the key factors involved in the cross talk between the parasite and the host's immune system during the blood and liver stages of the malaria parasite life cycle in different non-human primate (NHP) species and origins using 'omics (proteomics, transcriptomics, metabolomics), immunological, molecular and parasitological approaches. As disease is only seen due to blood stage malaria and this is clinically the most relevant stage, we will start with investigations of blood stage malaria in NHP. At a later stage we will also include liver stages, as they are also very relevant for vaccine development. Understanding the key factors involved in parasite-host interactions will inform the development of effective vaccine against malaria and may also give us insights into pathways that can be targeted using drugs. An additional direct aim of this application is to establish combinatorial biomarkers for the different stages of illness and surrogate biomarkers of protection, as well as immune correlates. In this context, the key factors identified in the study of the cross talk between the parasite and the host's immune system during the blood and liver stages of the malaria parasite life cycle in different non-human primate (NHP) species and origins, will initially be used to define (bio)markers of susceptibility to malaria and disease progression into malaria complications (different forms of malaria disease). The increased knowledge of the specific mechanisms underlying the illness and the immune response can also be used in the future for training in silico prediction models that would reduce the number of animals used in vaccine experiments and refine such experiments.
In parallel, a direct aim of this research will be to assess novel vaccine candidates, innovative vaccinations strategies and adjunct therapies developed in collaboration with international consortia comprising industrial and academic partners and chosen based on evidence derived from literature and other *in vivo* studies about their potential.

At this moment, the institute at which this research is carried out is the only one in Europe with routine experience in the study of NHP malaria parasites. Particularly important for such studies is the institute's unique combination of experience in the study of NHP malaria parasites in non-human primates (14), 'omics technologies and systems analysis (15). With this unique set of experiences and knowledge gained through years of work in the field, the feasibility of the proposed project can be considered very high.

Referenties

1. WHO, The Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030, January 2016
2. Andrade BB, et al. Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106 Suppl 1: 70-8
3. Nussenzweig, R., J. Vanderberg, and H. Most, *Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of Plasmodium berghei. IV. Dose response, specificity and humoral immunity.* Mil Med. 1969; 134(10): 1176-82
4. https://www.malariavaccine.org/malaria-and-vaccines/vaccine-development/life-cycle-malaria-parasite;); Wipasa J, Elliott S, Xu H, Good MF. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. Immunol Cell Biol. 2002 Oct;80(5):401-14
5. *Vaccines Against Malaria: Hope in a Gathering Storm*, P.K. Russell and C.P. Howson, Editors. 1996: Washington (DC)
6. 10.2.g

10.2.g

7. Partnership SCT (2015) Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised controlled trial. *Lancet* 2015; 6736(15)
8. https://www.reuters.com/article/health-malaria-vaccine/insight-caveats-costs-and-complexities-shadow-first-malaria-vaccine-idUSL8N0ZG3UE20150714
9. Tuju J, Kamuyu G, Murungi LM, and Osier FHA Vaccine candidate discovery for the next generation of malaria vaccines Immunology. 2017 Oct; 152(2): 195–206
10. Thomas D, Tazerouni H, Sundararaj KG, Cooper JC Therapeutic failure of primaquine and need for new medicines in radical cure of Plasmodium vivax. Acta Trop. 2016;160:35-8
11. Langhorne J and Cohen S. Plasmodium knowlesi in the marmoset (Callithrix jacchus) Parasitology. 1979 Feb;78(1):67-76
12. 10.2.g
13. Wolf AS et al. Front Immunol. 2017;8:212
14. 10.2.g
16. Guilbride et al. PLoS One 2010, 5, e10685; Guilbride et al. Trends Parasitol 2012, 28, 142-150

3.3 Relevance

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

In order to tackle knowledge gaps in malaria vaccine development it is necessary to investigate parasite-host interactions in models relevant to human malarias.

NHP models of human malarias have a special place in this research due to the high relatedness of the immune system of NHP and humans and due to the fact that the infection of non-human primates with simian parasites best reflects the different aspects of human disease.

Currently, the research questions tackled in this application are clinical in nature and will in the long run have practical implications for the development of effective vaccines, as a thorough understanding of parasite-host interactions will lead to new ways to interfere and provide better immunity to malaria infection. Furthermore, the study of parasite-host interactions is of more fundamental nature and will yield insights in a number of important pathways. Some of the emerging pathways in malaria parasites may be good drug targets, which can further be validated to provide anti-malarial therapies.
A better understanding of parasite-host interactions and the availability of validated combinatorial biomarkers would for example:

1. allow for the development of better biomarkers for malaria complications, to differentiate true clinical malaria from other diseases with a similar presentation when malaria parasitaemia is coincident (particularly where parasite prevalence is high so that most people will be infected but not necessarily symptomatic), allowing clinicians to identify appropriate treatments.
2. provide a tool to distinguish the different malaria presentations (uncomplicated (no clinical symptoms), mild (low parasitemia) and complicated (high parasitemia, fever, tissue sequestration))
3. provide prognostic indicators for clinical trials and epidemiology studies
4. allow further investigation into the mechanism(s) of disease by using biomarkers to identify critical biological pathways to support the development of new therapies for malaria complications.

While the study of parasite-host interaction to address questions concerning the vaccination paradigm by testing innovative theories in the realm of vaccine efficacy and failure including e.g. the hypothesis that

sporozoites in the skin may induce tolerance (16) is a long-term strategy, the urgent need for vaccines requires also more short-term strategies. In parallel, to our studies of parasite-host interactions, which will inform malaria vaccinology study now and, in the future, we will therefore continue our efforts aimed at the study and assessment of new malaria vaccine candidates and malaria vaccine strategies (e.g. vaccination under chemoprophylaxis) directly aimed at finding new, more effective vaccines that will elicit (ideally life-long) sterile protection. The study and assessment of new adjunct therapies (e.g. immune therapy and other host-directed therapies) will offer new tools to treat malaria complications or prevent them e.g. by tweaking the immune system's own response when biomarkers of disease progression into complications are detected, by interfering with pathways and mechanisms underlying the development of malaria complications etc.

3.4 Research strategy

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

The project consists of three different components: the study of parasite-host interactions in NHP models relevant to human malarias (component 1), the assessment of new vaccine candidates and vaccination strategies (component 2) and the assessment of adjunct therapies (component 3). Adjunct therapies include e.g. immune therapy and other host-directed therapies.
The different components are in principle independent of each other but should be seen as complementary as knowledge acquired in component 1 will always be used to inform research into components 2 and 3. The research on the three components can therefore take place in parallel. Research carried out under component 1 is part of a long-term strategy to address the gap in malaria vaccinology. It aims primarily at devising a more rational approach to the design of vaccine strategies aimed at eliciting sterile (ideally life-long) immunity against malaria. Research carried out under components 2 and 3 follows traditional malaria vaccinology approaches such as vaccine trials and should be considered a short-term strategy aimed at addressing the urgent need for a malaria vaccine and adjunct therapies.

Components 2 and 3, will cover all aspects of malaria vaccinology and adjunct therapies. This will include, but not be limited to the assessment of safety, immunogenicity and efficacy of vaccine candidates, vaccine components (e.g. adjuvants), vaccine formulations and adjunct therapies. When necessary, this may include e.g. dose escalation and pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD experiments aimed at finding the right therapeutic dose. The assessment of new vaccine strategies (e.g. vaccination under chemoprophylaxis) will include, but not be limited to the testing of radical new thinking and immunological models with major implications for vaccine efficacy/failure and strategies aimed at modulating critical pathways involved in the pathophysiology of malaria.

Next to the applied aims of components 2 and 3, the study of the parasite-host interactions (component 1) in this project will increase our understanding of the mechanisms behind the pathogenesis of and the immunity to malaria using NHP models relevant to human malarias e.g. specific parasite-host combinations best reproducing specific aspects of human disease. We will also attempt to uncover and validate combinatorial biomarkers for the different stages of illness and surrogate biomarkers of protection, as well as immune correlates. Component 1 is an important aspect of the research strategy at it will contribute critical knowledge to the refinement of studies in components 2 and 3 and pave the way to a more rational design of new ways to interfere with the disease and provide better immunity to infection. This component will include (but not be limited to) the study of the cross-talk between parasite and immune system, the characterization of infection in specific parasite-host combinations (e.g. specific genetic background), the mechanisms underlying specific disease presentations. These studies will be carried out through immunological and parasitological approaches, the global screening of host immune responses using omics technologies, and the registration of different clinical parameters (e.g. hematology, clinical chemistry etc.) during and after studies (using stored biomaterials and samples). All samples (e.g. serum, blood cells, tissue samples, RNA etc.) collected during studies under components 1, 2, 3 will be either used on-line or stored for future use in our experimental biobank.

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 component the type of animal experiment will be the malaria infection of NHPs (macaques **(appendix 1)** and/or marmosets (**appendix 2**)). Here, NHPs are infected with a specific simian malaria parasite strain to model and study specific aspects of human infection and human disease. Blood drops are taken to monitor the parasitemia course, while blood samples are taken to monitor clinical chemistry, hematology and isolate cells from the blood compartment (e.g. immune cells). If necessary for the scope of the study, animals are sacrificed at the end of the study to harvest tissues and isolate e.g. tissue immune cells. This may for example be the case when the response to infection needs to be assessed also in the tissues where the bulk of the immune response against to malaria is known to occur.
In the second and third component the type of animal experiments will be malaria infection in rhesus macaques **(appendix 1)**. Here the rhesus macaque will be infected with the most appropriate simian parasite to study the efficacy of the vaccine or adjunct therapy that needs to be assessed e.g. with either *P. knowlesi* or *P. coatneyi* (to mimic *P. falciparum*), with *P. cynomolgi* (to mimic *P. vivax*) etc. The assessment of vaccine and adjunct therapies will be designed as required by the specific strategy or candidate to be tested, minimally to include always a control group and an experimental group. **(appendix 1)**. Additionally, it may be necessary to carry out PK/PD studies in some instances where the right dose of a therapeutic is not known *a priori* and cannot be inferred from existing data **(appendix 3)**.

Use of donors

Donor animals may be required for some of these studies: donor monkeys are required to obtain blood stage parasites, which will be fed *ex vivo* to mosquitoes. e.g. in studies using sporozoites as vaccines or for challenge; in studies of parasite-host interaction requiring sporozoite infections. Donor monkeys may also be required in studies in which parasites first need to be adapted to *in vivo* growth in a specific host which then serves as parasite donor for the other animals used in the study e.g. of parasitemia kinetics and their links to disease progression and manifestation. Procedures for these instances do not differ from the standard malaria infection of NHPs as described in **(appendix 1)**.

Criteria for the selection of different NHP species and proposed studies

Testing of vaccine candidate, innovative vaccination strategy and adjunct therapies

The testing of vaccine candidate, innovative vaccination strategy and adjunct therapies will generally be carried out in Rhesus macaques as for therapy testing this is a well-established animal model. Only when the target parasite (e.g. *P. brasilianum/malariae*) or the specific disease presentation cannot be assessed in macaques, the marmoset will be used. As the marmoset malaria model is less characterized than are the macaque models, vaccine and adjunct therapy studies will only be carried out in this model after the model has been fully characterized. Whenever vaccines or adjunct therapies are tested in any model the criteria set forth in appendix 1A will be strictly followed.

Parasite-host interaction studies

Rhesus macaques, cynomolgus macaques and marmosets will be used to dissect specific aspects of parasite-host interactions such as the cross-talk between malaria parasites and the host immune system. In this context, each parasite-host interaction model has its specificities and will be investigated through a combination of detailed immunological, 'omics and parasitological studies.

In the specific case of the marmoset, where limited literature is available on the use of this non-human primate species for the modelling of parasite-host interactions in malaria, the first priority will be to fully characterize and establish the models using specific simian parasite species e.g. *P. brasilianum/malariae* (e.g. best suited for the modelling of human Plasmodium malariae), *P. knowlesi* (e.g. best suited to study susceptibility according to available literature) and others. The model will be considered fully characterized when the course of the infection including parasitemia, disease manifestation and disease progression has been established and analysed in basic pathological and immunological terms.

The choice of a parasite-host combination will depend on the specific question at hand:
some questions can only be studied in a specific non-human primate-parasite combination, while for answering questions related to malaria susceptibility, disease manifestations including underlying mechanisms, models will be selected that are expected to yield complementary insights in the immune response as explained below:

The disease presentation in the rhesus macaque, the experimental host of several simian malaria parasites, is more acute than that observed in the natural host, the cynomolgus macaque, which is more chronic. Comparison of biomarkers of infection, protection and immune correlates may help explain how the cynomolgus macaque is able to control the infection in ways that the rhesus macaque does not leading to a better understanding of what mechanisms we need to trigger during vaccination to control and ultimately prevent the infection.

Marmosets will be used in a limited number of instances:
1. when parasites cannot be modelled in macaques but can be modelled in marmosets (e.g. *P. brasilianum*, which is an excellent model for the *P. malariae* human malaria); 2. to study malaria susceptibility as marmosets, like humans, are naturally differentially susceptible to malaria infection e.g with the human zoonotic parasite *P. knowlesi*; 3. when intra-vital imaging will be used to follow the infection course, as the small size of marmosets makes them particularly suitable for bioimaging; 4. when specific aspects of the immune system's response to disease are studied (e.g. T and B cell-mediated responses) as marmosets give birth to naturally occurring bone-marrow chimeric twins (hematopoietic mosaicism derived from placenta sharing during gestation), which are ideal for these purpose and 5. when marmosets give rise to a disease presentation that better mimics aspects of the human disease than the macaque disease presentation.

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 different components form the extended sequence of conventional vaccine development platforms. Component 1 reflects aspects of the discovery in the vaccine development pipeline such as infection and disease modelling, combinatorial biomarker research and the study of mechanisms underlying immunity to malaria. A better understanding of the cross-talk between the malaria parasite and the host immune system will allow for the rational design of vaccine strategies aimed at eliciting sterile (ideally life-long) immunity against malaria and thus directly impact vaccine development.
Component 2 and 3 reflect the more applied aspects in the vaccine development pipeline such as the pre-clinical assessment of vaccine candidates and adjunct therapies for their safety, immunogenicity and efficacy as well as research into innovative vaccine strategies based on radical new thinking and immunological models with major implications for vaccine efficacy/failure.
As in this case discovery is not related to uncovering of new vaccine candidates
The components are independent although it is expected that knowledge gained in component 1 will always inform research into components 2 and 3. PK/PD studies and dose escalation experiments are sub-components of components 2 and 3 and will only be carried out when the therapeutic dose needs to be established because it is unknown and cannot be inferred from
available data. Studies of the different components will be carried out in parallel. Knowledge gained in component 1 (e.g. combinatorial biomarkers) will be used to refine studies in components 2 and 3. Studies within a specific component will be carried out sequentially e.g. first PK/PD studies, then efficacy studies etc.

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	Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in macaque models relevant to human malaria
2	Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in marmoset models relevant to human malaria
3	PK/PD studie in rhesus macaques

4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

12

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: Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in macaque models relevant to human malaria

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.

Novel vaccine candidates and innovative vaccination strategies are typically tested using a control group and an experimental group. In specific cases, this design may require additional control groups e.g. a relapse monitor group (in the case of relapsing parasites); a comparative vaccine (e.g. RTS,S/ASO1) group etc. In some cases, it may be necessary to define the most appropriate therapeutic dose of a specific vaccine (e.g. in the case of vaccinations with live sporozoites, irradiated sporozoites, cryopreserved sporozoites, genetically attenuated parasites (GAP) etc.) prior to challenge. Thus, more than one experimental group might be needed. When testing adjunct therapies (such as immuno-therapies) it may be necessary to carry out PK/PD studies beforehand to establish the right dose e.g. of an antibody to be administered by e.g. defining its serum levels. These studies will only be necessary if the dose has not been established with certainty in preliminary tests (e.g. in rodents, in vitro) and cannot be inferred from existing data. While vaccines will be administered prior to challenge, adjunct therapies are in general tested during an on-going malaria infection to see if they are able to prevent e.g. certain disease manifestations, specific complications or the progression of the disease.

Criteria used for the testing of vaccines, vaccine strategies and adjunct therapies include:

- Vaccine candidates and formulations to be tested need to be of a sufficient quality to be used in animals. It must have been shown or be plausible to assume that such compounds to not comprise elements that can cause serious side effects in animals;

- Only the most promising vaccine candidates and formulations will be tested in non-human primate models. Screening of candidates will be done in vitro and in rodent species prior to selection of candidates for non-human primate vaccine studies.
- Adjunct therapies will only be tested in non-human primates when it is clear that the non-human primate model has advantages over in vitro or in rodent testing. This may be the case e.g. if the pathophysiological mechanism the adjunct therapy is expected to interfere with is different in rodents than in non-human primates and humans; if a specific cascade is absent or different in rodents and humans
- There is a hypothesis with regard to the presumed mechanism of action of the vaccine, vaccine strategy or adjunct therapy, which is based on scientific knowledge of the course of malaria infection or the immune response of the host to the infection.
- The assessment of new vaccine strategies (e.g. vaccination under chemoprophylaxis) will include, but not be limited to the testing of radical new thinking and immunological models with major implications for vaccine efficacy/failure and strategies aimed at modulating critical pathways involved in the pathophysiology of malaria

The primary outcome parameter in vaccine studies is the level of protection from malaria after homologous and/or heterologous challenge. In the best-case scenario, a vaccine or vaccine strategy is able to provide the subject with long-term (ideally: life-long) sterile protection. In the best-case scenario, an adjunct therapy is able to prevent a specific disease manifestation, a complication or the progression of the disease.

Studies of parasite-host interaction/malaria disease modelling in non-human primates

As human parasites are difficult to study in experimental models and studies in humans are restricted for a variety of ethical reasons, the modelling of complex pathophysiological events involving the immune system requires intact parasite-host combinations. The modelling of complex pathophysiological events is crucial for the understanding of the regulatory mechanisms underlying the interplay between the parasite and its host. Knowledge of such mechanisms will make it possible to design effective vaccines and adjunct intervention strategies. Simian parasite-NHP combinations are the species of choice to conduct these studies because the immune system in NHP is closely related to that of humans and the infection of non-human primates with simian parasites best reflects the different aspects of human disease. A high level of heterogeneity (e.g. multiple infections, inter-human differences as to immunological status at infection, large differences in diet, age etc.) characterizes human infections in the field making it very difficult to determine the key factors underlying disease control and disease progression into complications. The use of NHPs in a controlled environment, infected with one parasite at a time as models for malaria infection, gives a unique opportunity to study the interplay between genetic background, host immune reactions and parasite virulence. In this context, the animal colony of at the institute in which the research is going to be carried out has several advantages: animals are typed for immune markers (e.g. MHC, KIR) and the colony is outbred and thus better represents the large variation of human population. Macaque models of malaria are better characterized than marmoset models and are thus initially the model of choice, particularly for vaccine studies. In the context of parasite-host interactions, as described in detail in appendix 2, the marmoset has specific advantages that are expected to yield complementary insights on the immune system and will therefore be used in a limited number of cases to model e.g. malaria susceptibility and specific disease presentations. The rhesus macaque is the experimental host of some simian malaria leading to a disease presentation that is more acute than in the natural host, the cynomolgus macaque. Comparison of biomarkers of infection, protection and immune correlates may help explain how the cynomolgus macaque is able to control the infection in ways that the rhesus macaque does not leading to a better understanding of what mechanisms we need to trigger during vaccination to control and ultimately prevent the infection.

In studies of malaria parasite-host interactions the primary outcome will depend on the purpose of the study in question e.g. correlates of immunity, biomarkers of protection or disease course.

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

In the case of a study aimed at the evaluation of a vaccine and vaccine strategy, the administration of the vaccine will take place before the challenge with a specific malaria parasite or parasite strain. The length of this phase depends on the vaccination strategy e.g. primary immunization only, primary immunization followed by several booster vaccinations, vaccine administration under chemoprophylaxis

or other. Typically, the length of this phase is between 12 and 28 weeks. Adjunct therapies (e.g. therapeutic or immune-modulatory regimes) are generally administered after parasite infection.

Vaccines and adjunct therapies can be administered through a number of different routes (intradermal, subcutaneous, intravenous, intramuscular, mosquito bites etc.) and with a frequency that strictly depends on the type of substance e.g. its half-life, solubility, formulation.

Parasite infections (e.g. study of parasite-host interactions; challenge during a vaccine or adjunct therapy study) are performed under sedation through direct intravenous, subcutaneous or intradermal injections; mosquito bites can also be used to better mimic the field situation. The choice of a specific parasite infection route strictly depends on the purpose of the experiments and the questions at hand. In parasite-host interaction studies the type of parasite-host combination chosen will determine the nature of the infection. The nature of infection is a primary parameter in the study of disease presentation, disease mechanisms and disease progression; immunity to malaria; biomarkers of susceptibility, protection, immune correlates. A specific parasite-host combination is chosen based on the purpose of the experiment, the experimental question to be answered, the relevance of the model for human disease. The model chosen in turn influences the frequency with which specific biotechnical procedures need to be carried out including e.g. the type of drug treatment that needs to be applied at the end of the experiment to cure the animals

Small blood draws are carried out through a needle prick in the thigh of an infected animal e.g. to monitor the parasitemia.

Larger bleedings are always performed under sedation e.g. to measure clinical chemistry and hematology parameters, to isolate immune cells to perform immunological assays, for 'omics studies etc. The frequency of larger blood withdrawals depends on the purpose of the experiment. In general, blood volumes to be taken will not exceed a maximum of 1% of the body weight per 4 weeks (and 0.7% max per bleeding).

Skin biopsies and liver biopsies may be applied to study the immunity to the pre-erythrocytic phase of the malaria infection, which has been recognized as an attractive vaccination target (Nat Rev Microbiol. 2013 Oct;11(10):701-12). Until now, some intravital studies as well as skin biopsies have been performed in rodents for analysis of early pre-erythrocytic immunity. However, it is unclear how relevant these studies are to the human situation given that mouse immunity can be considerably different from human immunity to malaria. Skin and liver biopsies are performed to study the early timepoints directly after infection with sporozoites and their migration to the liver and allow to test innovative theories according to which e.g. sporozoites in the skin may induce tolerance (Guilbride et al. PLoS One 2010, 5, e10685 and Guilbride et al. Trends Parasitol 2012, 28, 142-150). In monkeys, biopsies will be carried out under sedation and the animals will receive analgesics. The spot of skin biopsies will be stitched. Prior to liver biopsy, the coagulation cascade will be tested as to reduce the risk of haemorrhagic events. The liver biopsy procedure will be guided by an ultrasound.

Treatment of blood stage malaria is performed through i.m. injections with antimalarial drugs. If a monkey is infected with sporozoites of a NHP malaria species that forms hypnozoites, the monkey will receive the standard radical treatment comprising anti-blood stage drugs (i.m. injections) and specific anti-liver stage drugs (oral administration). Animals are trained to cooperate with procedures such as i.m. administrations, oral administration and small blood draws through positive reinforcement training.

In studies in which it is necessary to look at the tissue (e.g. liver, spleen, lymph nodes, bone-marrow) immune responses (which cannot be looked at in humans), which are thought to critically contribute to a protective effect against malaria, the euthanasia will take place on fixed endpoint unless human endpoints are reached beforehand (which is unlikely to be the case).

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

The primary outcome parameter in vaccine studies is the level of protection from malaria after homologous and/or heterologous challenge. In the best-case scenario, a vaccine or vaccine strategy is able to provide the subject with long-term (ideally: life-long) sterile protection. The primary outcome parameter for adjunct therapies is their ability to prevent a disease manifestation a complication or the

progression of the disease as a whole. In the best-case scenario, an adjunct therapy is able to prevent a specific disease manifestation, a complication or the disease as a whole. In studies of malaria parasite-host interactions the primary outcome will depend on the purpose of the study in question e.g. correlates of immunity, biomarkers of protection or disease course. The number of animals will be restricted to the minimum necessary to obtain statistically significant data. Each study will be preceded by a thorough statistical analysis to determine the minimum number of animals per group necessary to achieve the aims of each study. In parasite-host interaction studies this may include, but is not limited to, the use of a priori sample size algorithms for multiple regression, that are able to estimate sample-size and power in R by exploring simulated study outcomes; in vaccine power studies different statistical methods can be applied depending on the scope of the study such as Fisher's exact test; Kaplan-Meier survival curves tested with log-rank tests; parasitemia courses over time can be modelled using non-linear mixed effects models (NLME). An increased knowledge of the specific mechanisms underlying the illness and the immune response gained through the study of parasite-host interactions can also be used in the future for training *in silico* prediction models that would reduce the number of animals used in vaccine experiments and refine such experiments. Whenever possible control groups and donor monkeys will be combined between studies.

B. The animals

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

Macaca mulatta (adult; female and male). Estimated number of animals: ca. 85 animals over a total of 5 years; estimated number of studies vaccine candidate testing, vaccine strategies and adjunct therapies: n=3; estimated total 40 animals, estimated 4 animals per group; estimated 3-4 groups per study; estimated number of studies parasite host interactions: n=3; estimated total 40 animals; estimated 6-8 animals per group (4 animals if recent preliminary data in 2-4 animals have already been acquired); 2-4 groups; estimated number of donors: n=5; *Macaca fascicularis* (adult; female and male). Estimated number of animals: ca. 40 animals over a total of 5 years; estimated number of studies parasite host interactions: n=3; estimated total 40 animals; estimated 6-8 animals per group; estimated 2-3 groups; estimated number of donors: n=2:

The 85 rhesus macaques will be used in parasite-host interaction studies aimed at e.g. disease modeling, research into the mechanisms behind malaria immunity, the definition of biomarkers of protection, disease progression and immune correlates, and in studies of the safety, immunogenicity and efficacy of novel vaccine candidates, innovative vaccine strategies and adjunct therapies. By application of the appropriate statistical modeling (e.g. power calculation) on a case by case basis as described above, the animal group size will be determined depending on the type (e.g. vaccine and adjunct therapy studies, parasite-host interaction studies) and purpose of the experiment. Based on our experience, the group size can vary between 4 and 8 animals per group. The group composition will be homogenous. The animals will be coming from the institute's own colony and only in special cases be sourced from an authorized importer following EU guidelines. In general, for the study of vaccine and adjunct therapies an experimental (vaccinated) and control group will be used. However, in some cases it may be necessary to diverge from this standard experimental design and introduce additional groups e.g. a relapse monitor control group (in the case of studies with relapsing parasites); a vaccine comparison group (e.g. RTS,S or other) in the case of comparative vaccine efficacy studies. A number of donor monkeys may need to be used e.g. when immunization, challenge or parasite host interaction studies require obtaining sporozoites or when experimental animals need to be infected with a NHP-passaged stock.

The parasite-host combination chosen each time will be the best one for the purpose of the experiment. Vaccine studies under this proposal will in general be carried out using the well-established standard models *P. knowlesi*-rhesus macaque as a proxy for *P. falciparum* human malaria and *P. cynomolgi*-rhesus macaque as a proxy for *P. vivax or P. ovale* human malaria. Only on rare occasions and for specific purposes (e.g. evaluation of therapies for *P. malariae* human malaria) we may opt for another parasite-host combination and only if it better represents the human malaria than the standard combinations for a particular aspect of the disease. Parasite-host interaction will be evaluated in the model that is best suited to answer the questions at hand e.g. on the mechanisms behind a specific malaria disease presentation, on specific aspects of the immunity to malaria, on specific aspects of the interplay between genetic background, parasite virulence and host immune system etc.
In some cases, when parasite-host interactions are the object of study, it may be necessary to compare the infection in rhesus monkeys with the infection in cynomolgus monkeys. While the rhesus monkey is

an experimental host for several simian malaria parasite species and strains, the cynomolgus monkey is a natural host. The disease presentation, the ability to control parasitemia and the susceptibility to infection often varies for a specific parasite species or strain between experimental and natural host. These differences are likely based in differences in the native and innate immunity to malaria between the rhesus and the cynomolgus macaque, which are valuable in parasite-host interaction studies as they may lay bare biomarkers of disease progression, disease control, protection and immune correlates. Also, understanding the mechanisms behind the differences in immunity to malaria between rhesus and the cynomolgus macaque may highlight new avenues of treatment e.g. new targets for vaccine and adjunct therapies.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals to be used in these experiments, may have been used in other studies. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal frameworks described in art. 1e of the law on animal testing.

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

☒No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement.
No *in vitro* system exists to date that can reproduce the complexity of an organism's immune system. These experiments need to be performed in live animals, because we need to investigate the reaction to vaccination and challenge of the different soluble and tissue components of the immune system to determine the safety and efficacy of vaccines, vaccine strategies and adjunct therapies. In this context, we will test radical new thinking and immunological models with major application for vaccine efficacy/failure; and conduct parasite-host interaction research aimed at uncovering the immune responses conferring protective immunity to malaria; the mechanisms behind the variable susceptibility to malaria resulting in different disease presentations; biomarkers of protection, disease progression and complications and correlates of immunity for malaria vaccines. Ultimately, the combination of these insights will lead to the rational design of better therapies for malaria.
Whenever new vaccines are being tested in non-human primates, preliminary rodent experiments have usually been conducted to test safety, immunogenicity and efficacy. As a next step, we use the non-human primate malaria models, as the immune system of the non-human primate and of humans has great similarity in the response to malaria infection. To answer some of the questions underlying vaccine efficacy and vaccine failure, as well as to conduct research into correlates of protection, rodent models are inadequate, as we need a host that is as closely related to humans as possible. Adjunct therapies and vaccines strategies are also tested in mice or experimental models of human malaria (CHMI), but there are a number of significant limitations to the insights that can be obtained using these models.

The immune system of rodents is significantly different from that of humans when it comes to the response to malaria, specific human disease presentations cannot be accurately modelled in rodents and the study of parasite-host interactions is thus limited to mechanisms that show commonalities between rodents and humans (Trends Parasitol. 2010 Jan; 26(1): 11–15). Controlled Human Malaria Infection (CHMI) models have a number of disadvantages:

- they are limited to *P. falciparum*;
- no tissue sampling is possible in humans, although the bulk of the protective immune response to malaria happens in the tissues;
- patients need to be cured at a low parasitemia, which limits the possibility to assess immune mechanisms;

- limited amounts of (*P. falciparum*) parasite strains for heterologous challenge are available and highly standardized parasite and strains are difficult to establish (e.g. in the case of blood stage CHMI),
- no standardized CHMI methodology and reagents across different centres (*Infect. Immun. January 2018 vol. 86 no. 1 e00479-17)*

The study of vaccines in the *P. knowlesi-Macaca mulatta* infection model has the advantage that it bears strong resemblance to *P. falciparum* human malaria. Not only is *P. knowlesi* malaria a human zoonosis, but macaques, like humans can be infected several times and have a similar response to infection. Furthermore, as we intend to culture the parasites in the plasma of the vaccinated animals and untreated controls from the day of challenge infection, it is important to use a *Plasmodium* species that can be cultured *in vitro*. *P. knowlesi* together with *P. falciparum* is the only *Plasmodium* species that has successfully been adapted to long-term *in vitro* culture. As detailed in the application, the parasite-host combinations, which will be chosen, will be selected based on the relevance for the different human malarias.

Reduction. The donor monkeys are used efficiently in that in transmission experiments, we are feeding the maximum number of mosquitoes, which we can handle in each experiment (1000-1500), to yield large numbers of sporozoites for further studies. Efficient use will be made of infected blood harvested from donor monkeys (e.g. immunological, 'omics, parasitological studies will be carried out), thus reducing the number of monkeys needed for infection.
Whenever possible, donor monkeys and control groups will be combined between experiments.
Prior to vaccine and adjunct therapy studies as well we prior to parasite-host interaction studies, the minimum number of animals required to obtain significant results will be determined using appropriate statistical methods. The statistical method may vary depending on the type and scope of the experiment and will be specified in the IvD protocol.

Refinement. The blood-stage parasitemia of NHP-parasites in rhesus monkeys is reasonably predictable, both in the case of blood stage and sporozoite infections. Through this knowledge we can restrict the needed thigh pricks to a minimum (in any case in parasite infections that have been used in rhesus monkeys before). For "uncharacterized" parasites the parasitemia development may be less predictable, but in such cases, we plan thigh pricks strategically around periods in which parasites are being expected to reduce the discomfort for the animals, while being able to follow the parasitemia development accurately nonetheless. Moreover, we are using trained animals (positive reinforcement training), which voluntarily offer their thigh for a prick, after which they receive a reward. This reduces the stress for the animals. The mosquito feedings on sporozoite donors are performed *ex vivo*, so that the animals do not suffer from the mosquito bites. After infection, the animals are scored daily to assess clinical symptoms by using a clinical scoring list. Appropriate human endpoints will be in place to prevent animal suffering in unforeseen circumstances.

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

The malaria infection itself gives mild malaria symptoms (at higher parasitemia), such as fever, anaemia, decreased appetite and reduced activity when the parasite ruptures from the infected red blood cell. Analgesics will be used in the case of biopsies. Animal caretakers check the animals on a daily basis and warn the researcher when needed. The development of the infection is closely watched and the infection is immediately cured if the above-described symptoms of infection worsen or continue for more than half a day. Human endpoints are determined beforehand to limit the discomfort in unforeseen circumstances. The use of trained animals, as described above, reduces the stress the animals experience during handling.

Environmental effects. NHP parasites are class 2 organisms and experiments with these parasites are carried out under containment level 2. Infected mosquitoes are handled in a specially equipped mosquito laboratory, where the work protocols focus on preventing the escape of malaria infected mosquitoes. As far as is known, there are no mosquito populations able to transmit the above-mentioned NHP malaria parasites in The Netherlands.

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. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

In the event in which skin or liver biopsies will be carries out, appropriate analgesia will be applied.
It is not expected that vaccination and challenge will provide discomfort to the animals. In our experience, even when vaccination and/or challenge are performed using mosquito bites, the animals are not suffering discomfort. However, animals are continuously observed if signs of mild discomfort due to e.g. itching or irritation are detected e.g. after vaccination and/or challenge happen via mosquito bite, appropriate treatment e.g. creams against itching will be applied to the affected body part of the monkey in such cases.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Discomfort by recovery from the sedation.
Reaction to vaccination or adjunct therapy
Mild to moderate malaria symptoms can occur. Short fever spikes, anaemia as mentioned, whether or not accompanied by a lack of appetite and / or reduced activity. These symptoms occur only at higher parasitemias and for a short period when parasites burst from infected red blood cells.

Explain why these effects may emerge.

Awakening from sedation can cause disorientation and nausea

When the blood stage parasite multiplies, it ruptures the red blood cell to invade a new one. This rupture causes toxic chemicals to be released in the blood stream, which can lead to mild malaria symptoms (fever, anaemia).

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

16 hours before sedation animals will have to fasten, to avoid that animals start vomiting on waking up from the sedation.

In general, the symptoms of malaria in most NHP species are very mild at low parasitemia and are therefore hardly observed. Very mild malaria symptoms disappear spontaneously after a few hours, when the red blood cell rupture is over. If animals develop more severe symptoms, the parasitemia is immediately determined and if the parasitemia appears to be exceptionally high (>15%), the animals are immediately cured with chloroquine injections or if the scope of the protocol foresees it, sacrificed. Vit B and iron supplements will be administered i.m. to help the animals recover from anaemia when required.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

☐ No > Continue with question K.

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

If an animal unexpectedly becomes severely sick with an extremely high parasitemia that cannot be treated on time, this will be considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

Based on previous experience mild discomfort is expected for most parasite donors and most animals used for the testing of vaccines, vaccine strategies and adjunct therapies (ca. 50% of the animals); moderate discomfort (ca. 50% of the animals), if many pricks in the upper leg are required e.g. to study *in vivo* growth, monitor parasitemia during parasite-host interaction studies, or when the malaria symptoms are more serious than expected.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

In studies (70%) in which it is necessary to look at the tissue (e.g. liver, spleen, lymph nodes, bone-marrow) immune responses, which cannot be looked at in humans and which are thought to critically contribute to a protective effect against malaria, the euthanasia will take place on fixed endpoint unless human endpoints are reached beforehand. 30% of animals will be cured and return to the experimental stock.

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: 2 Type of animal procedure: Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in marmoset models relevant to human malaria

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.

Simian parasite-NHP combinations are the species of choice to conduct these studies because the immune system in NHP is closely related to that of humans and the infection of non-human primates with simian parasites best reflects the different aspects of human disease. The use of NHPs in a controlled environment, infected with one parasite at a time as models for malaria infection, gives a unique opportunity to study the interplay between genetic background, host immune reactions and parasite virulence. In this context, the animal colony of at the institute in which the research is going to be carried out has several advantages: animals can be typed for immune markers (e.g. MHC, etc.) and the colony is outbred and thus better represents the large variation of human population.

The marmoset malaria model is less characterized than are the macaque models, the first step will therefore be to better characterize the model during the course of specific parasite-host interaction studies. Vaccine and adjunct therapy studies will only be carried out in this model when the model has been fully characterized and when the target parasite or the specific disease presentation cannot be assessed in macaques. Whenever vaccines or adjunct therapies are tested in this model the criteria set forth in appendix 1A will be strictly followed.

In studies of malaria parasite-host interactions the primary outcome will depend on the purpose of the study in question e.g. correlates of immunity, biomarkers of protection, susceptibility or disease course.

However, the marmoset has added value on several levels: 1. Some parasites cannot be modelled in macaques but can be modelled in marmosets (e.g. *P. brasilianum*, which is an excellent model for the *P.*

malariae human malaria); 2. marmosets, as humans, are naturally differentially susceptible to malaria infection e.g with the human zoonotic parasite *P. knowlesi*; 3. due to the small size marmosets are suitable for bioimaging; 4. marmosets give birth to naturally occurring bone-marrow chimeric twins (hematopoietic mosaicism derived from placenta sharing during gestation), which are ideal to study the immune system's response to disease e.g. study of T and B cell-mediated responses and 5. marmosets give rise to a variable disease presentation that mimics several aspects of disease in humans.

The differences in susceptibility accounts for the need to have larger groups in these parasite-host interaction studies to ensure the statistical significance of results (in our experience 8 to 12 animals per group need to be used). Donor animals may be needed e.g. for *ex vivo* mosquito feeding or when experimental animals need to be infected with an NHP-passaged stock.

In terms of phases, we have a first phase during which parasite-host interactions will be studied in the marmoset with an eye to the in-depth characterization of the model. In this phase it may be necessary to use donor animals e.g. when infections with sporozoites need to be carried out to characterize the parasite-host interaction during the exoerythrocytic stage of infection. Only after an in-depth characterization of the model has been obtained, a next phase will ensue in which in which studies of therapeutics are carried out in the marmoset-parasite model. This model will only be used for such studies if the target parasite or the specific disease presentation cannot be assessed in macaques.

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

In the case of a study aimed at the evaluation of a vaccine and vaccine strategy, the administration of the vaccine/adjunct therapy will take place before the challenge with a specific malaria parasite or parasite strain. The length of this phase depends on the vaccination strategy e.g. primary immunization only, primary immunization followed by several booster vaccinations, vaccine administration under chemoprophylaxis or other. Typically, the length of this phase is between 12 and 28 weeks.

Vaccines can be administered through a number of different routes (intradermal, subcutaneous, intravenous, intramuscular, mosquito bites etc.) and with a frequency that strictly depends on the type of substance e.g. its half-life, solubility, formulation.

Parasite infections (e.g. study of parasite-host interactions; challenge during a vaccine study) are performed under sedation through direct intravenous, subcutaneous or intradermal injections; mosquito bites can also be used to better mimic the field situation. The choice of a specific parasite infection route strictly depends on the purpose of the experiments and the questions at hand. In parasite-host interaction studies the type of parasite-host combination chosen will determine the nature of the infection. The nature of infection is a primary parameter in the study of disease presentation, disease mechanisms and disease progression; immunity to malaria; biomarkers of susceptibility, protection, immune correlates. A specific parasite-host combination is chosen based on the purpose of the experiment, the experimental question to be answered, the relevance of the model for human disease. The model chosen in turn influences the frequency with which specific biotechnical procedures need to be carried out including e.g. the type of drug treatment that needs to be applied at the end of the experiment to cure the animals

Small blood draws are carried out through a needle prick in the thigh of an infected animal e.g. to monitor the parasitemia.

Larger bleedings are always performed under sedation e.g. to measure clinical chemistry and hematology parameters, to isolate immune cells to perform immunological assays, for 'omics studies etc. The frequency of larger bleedings depends on the purpose of the experiment. In general, blood volumes to be taken will not exceed a maximum of 1% of the body weight per 4 weeks (and 0.7% max per bleeding).

Treatment of blood stage malaria is performed through i.m. injections with antimalarial drugs. If a monkey is infected with sporozoites of a NHP malaria species that forms hypnozoites, the monkey will receive the standard radical treatment comprising anti-blood stage drugs (i.m. injections) and specific anti-liver stage drugs (oral administration). Animals are trained to cooperate with procedures such as i.m. administrations, oral administration and small blood draws through positive reinforcement training.

In studies in which it is necessary to look at the tissue (e.g. liver, spleen, lymph nodes, bone-marrow) immune responses (which cannot be looked at in humans), which are thought to critically contribute to a protective effect against malaria, the euthanasia will take place on fixed endpoint unless human endpoints are reached beforehand (which is unlikely to be the case).

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

The first studies in this model will be parasite-host interactions studies. Such studies are exploratory in nature. The primary outcomes will depend on the purpose of the study in question e.g. correlates of immunity, biomarkers of protection or disease course. Thus, the groups size will be determined based on the questions to be answered and based on previous experience. The testing of vaccines and/or adjunct therapies will be limited to specific cases in which they cannot be assessed in macaques.
The primary outcome parameter in vaccine studies is the level of protection from malaria after homologous and/or heterologous challenge. In the best-case scenario, a vaccine or vaccine strategy is able to provide the subject with long-term (ideally: life-long) sterile protection. In the best-case scenario, an adjunct therapy is able to prevent a specific disease manifestation, a complication or the disease as a whole. The number of animals will be restricted to the minimum necessary to obtain statistically significant data. Each study will be preceded by a thorough statistical analysis to determine the minimum number of animals per group necessary to achieve the aims of each study. In parasite-host interaction studies this may include, but is not limited to, the use of a priori sample size algorithms for multiple regression, that are able to estimate sample-size and power in R by exploring simulated study outcomes; in vaccine power studies different statistical methods can be applied depending on the scope of the study such as Fisher's exact test; Kaplan-Meier survival curves tested with log-rank tests; parasitemia courses over time can be modelled using non-linear mixed effects models (NLME). An increased knowledge of the specific mechanisms underlying the illness and the immune response gained through the study of parasite-host interactions can also be used in the future for training in silico prediction models that would reduce the number of animals used in vaccine experiments and refine such experiments. Whenever possible control groups and donor monkeys will be combined between studies.

B. The animals

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

Callithrix jacchus (adult; female and male). Estimated number of animals: ca. 48 animals over a total of 5 years (8-12 animals per group, anticipated number of studies = 4):

The parasite-host combination chosen each time will be the best one for the purpose of the experiment. Experimental models of the two most important human malarias (*P. falciparum* and *P. vivax*) are limited to chimpanzees (that are not used as models any longer), *Aotus* en *Saimiri* monkeys. The parasites must be adapted to these monkeys and most of the time it is necessary to splenectomize such animals to obtain blood stage infection with these parasites. Due to these restrictions and to the very limited availability of these monkey species for biomedical research, these models are rarely used, however valuable they may be. *P. ovale* and *P. malariae* suffer from the same limitations in terms of available models, while *P. knowlesi* (which is a zoonosis) infection can more easily be modeled e.g. in macaques or marmosets. Vaccine studies under this proposal will in general be carried out using the well-established standard models *P. knowlesi*-rhesus macaque as a proxy for *P. falciparum* human malaria and *P. cynomolgi*-rhesus macaque as a proxy for *P. vivax or P. ovale* human malaria. Only on rare occasions when the macaque models will not serve the purpose, we will opt for the marmoset as a model for specific parasite-host combinations (e.g. evaluation of therapies against *P. malariae* human malaria). In this context (as explained in detail above), marmosets have a special place as the modeling of malaria in marmosets is expected to provide complementary insights into the workings of the immune system (bone marrow chimeras), into specific human disease presentations, into the differential susceptibility to malaria and into specific parasites that are good models for human malaria species but cannot be studied in Rhesus macaques.
Overall, parasite-host interaction will be evaluated in the model that is best suited to answer the questions at hand e.g. on the mechanisms behind a specific malaria disease presentation, on specific aspects of the immunity to malaria, on specific aspects of the interplay between genetic background, parasite virulence and host immune system etc.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals to be used in these experiments, may have been used in other studies. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal frameworks described in art. 1e of the law on animal testing.

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

☒No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement. No *in vitro* system exists to date that can reproduce the complexity of an organism's immune system. These experiments need to be performed in live animals, because we need to investigate the reaction to vaccination and challenge of the different soluble and tissue components of the immune system to determine the safety and efficacy of vaccines, vaccine strategies and adjunct therapies. In this context, we will test radical new thinking and immunological models with major application for vaccine efficacy/failure; and conduct parasite-host interaction research aimed at uncovering the immune responses conferring protective immunity to malaria; the mechanisms behind the variable susceptibility to malaria resulting in different disease presentations; biomarkers of protection, disease progression and complications and correlates of immunity for malaria vaccines. Ultimately, the combination of these insights will lead to the rational design of better therapies for malaria. Whenever new vaccines are being tested in non-human primates, preliminary rodent experiments have been conducted to test safety, immunogenicity and efficacy. As a next step, we use the non-human primate malaria models, as the immune system of the non-human primate and of humans has great similarity in the response to malaria infection. To answer some of the questions underlying vaccine efficacy and vaccine failure, as well as to conduct research into correlates of protection, rodent models are inadequate, as we need a host that is as closely related to humans as possible. Adjunct therapies and vaccines strategies are also testing in mice or experimental models of human malaria, but limitation in the insights that can be obtained using these models (e.g. no tissue sampling in humans, although the bulk of the protective immune response to malaria happens in the tissues; absence of rodent models that reproduce specific human disease presentations etc.).

Reduction. The donor monkeys are used efficiently in that in transmission experiments, we are feeding the maximum number of mosquitoes, which we can handle in each experiment (1000-1500), to yield large numbers of sporozoites for further studies. Efficient use will be made of infected blood harvested from donor monkeys (e.g. immunological, 'omics, parasitological studies will be carried out), thus reducing the number of monkeys needed for infection.
Whenever possible, donor monkeys and control groups will be combined between experiments.
Prior to vaccine and adjunct therapy studies as well we prior to parasite-host interaction studies, the minimum number of animals required to obtain significant results will be determined using appropriate statistical methods. The statistical method may vary depending on the type and scope of the experiment and will be specified in the IvD protocol.

Refinement. The blood-stage parasitemia of NHP-parasites in marmoset is reasonably predictable, both in the case of blood stage and sporozoite infections. Through this knowledge we can restrict the needed thigh pricks to a minimum (in any case in parasite infections that have been used in marmosets before). For "uncharacterized" parasites the parasitemia development may be less predictable, but in such cases, we plan thigh pricks strategically around periods in which parasites are being expected to reduce the discomfort for the animals, while being able to follow the parasitemia development accurately nonetheless. Moreover, we are using trained animals (positive reinforcement training), which voluntarily

offer their thigh for a prick, after which they receive a reward. This reduces the stress for the animals. The mosquito feedings on sporozoite donors are performed *ex vivo*, so that the animals do not suffer from the mosquito bites. After infection, the animals are scored daily to assess clinical symptoms by using a clinical scoring list. Appropriate human endpoints will be in place to prevent animal suffering in unforeseen circumstances.

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

The malaria infection itself gives mild malaria symptoms (at higher parasitemia), as for example fever, anaemia, decreased appetite and reduced activity when the parasite ruptures from the infected red blood cell. Animal caretakers check the animals on a daily basis and warn the researcher when needed. The development of the infection is closely watched and the infection is immediately cured if the above-described symptoms of infection worsen or continue for more than half a day. Human endpoints are determined beforehand to limit the discomfort in unforeseen circumstances. The use of trained animals, as described above, reduces the stress the animals experience during handling.

Environmental effects. NHP parasites are class 2 organisms and experiments with these parasites are carried out under containment level 2. Infected mosquitoes are handled in a specially equipped mosquito laboratory, where the work protocols focus on preventing the escape of malaria infected mosquitoes. As far as is known, there are no mosquito populations able to transmit the above-mentioned NHP malaria parasites in The Netherlands.

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. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

In general, vaccine studies in the marmoset will be the exception and it is not expected that vaccination and challenge will provide discomfort to the animals. In our experience, even when vaccination and/or challenge are performed using mosquito bites, the animals are not suffering discomfort. However, animals are continuously observed if signs of mild discomfort due to e.g. itching or irritation are detected e.g. after vaccination and/or challenge happen via mosquito bite, appropriate treatment e.g. creams against itching will be applied to the affected body part of the monkey in such cases.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Discomfort during sedation by recovery from the sedation.
Reaction to vaccination
Mild to moderate malaria symptoms can occur. Short fever spikes, anaemia as mentioned, whether or not accompanied by a lack of appetite and / or reduced activity. These symptoms occur only at higher parasitemias and for a short period when parasites burst from infected red blood cells.

Explain why these effects may emerge.

The animals can experience hypothermia during sedation
Awakening from sedation can cause disorientation and nausea

When the blood stage parasite multiplies, it ruptures the red blood cell to invade a new one. This rupture causes toxic chemicals to be released in the blood stream, which can lead to mild malaria symptoms (fever, anaemia).

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

Hypothermia will be averted through the use of heating devices e.g. heat mats.
16 hours before sedation animals will have to fasten, to avoid that animals start vomiting on waking up from the sedation.

In general, the symptoms of malaria in most NHP species are very mild at low parasitemia and are therefore hardly observed. Very mild malaria symptoms disappear spontaneously after a few hours, when the red blood cell rupture is over. If animals develop more severe symptoms, the parasitemia is immediately determined and if the parasitemia appears to be exceptionally high (>15%), the animals are immediately cured with chloroquine injections or if the scope of the protocol foresees it, sacrificed. Vit B and iron supplements will be administered i.m. to help the animals recover from anaemia when required.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

☐ No > Continue with question K.

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

If an animal unexpectedly becomes severely sick with an extremely high parasitemia that cannot be treated on time, this will be considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

Based on previous experience mild discomfort is expected for most parasite donors and animals used for the testing of vaccines, vaccine strategies and adjunct therapies (ca. 20% of the animals); moderate

discomfort for animals used in parasite-host interaction studies (ca. 80% of the animals), if many pricks in the upper leg are required e.g. to study *in vivo* growth, monitor parasitemia during parasite-host interaction studies, or when the malaria symptoms are more serious than expected.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

In studies (80%) in which it is necessary to look at the tissue (e.g. liver, spleen, lymph nodes, bone-marrow) immune responses, which cannot be looked at in humans and which are thought to critically contribute to a protective effect against malaria, the euthanasia will take place on fixed endpoint unless human endpoints are reached beforehand. 20% of animals will be cured and return to the experimental stock.

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: PK/PD studies 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.

If insufficient data are available to establish dose and administration frequency of new treatments in the macaque malaria model, it may sometimes be necessary to determine the pharmacokinetics, pharmacodynamics (PK/PD) and/or optimal administration schedule of a new therapy, prior to testing the efficacy in a malaria study. Only if the criteria for testing new therapies defined in appendix 1 are fulfilled, it will be determined whether PK/PD studies are necessary.

Criteria that can lead to the assessment of PK/PD may include:

- Insufficient data to extrapolate dose and possibly frequency from previous studies, other species, comparable compounds.
- Where possible physiologically based pharmacokinetic modeling will be used to further supplement this data. However, for biologicals this method is not yet available for monkeys. An attempt will be made to develop this
- Small therapeutic index.

The experimental approach will always take the nature of the therapeutic into account.
In PK/PD studies the therapeutic is administered once or repeatedly. In general, the primary outcome is the concentration of the therapeutics in the blood, but in certain cases the purpose of the experiment may require the determination of the concentration of the therapeutics in the tissue. In the course of PD studies, the effects of the therapeutics on indirect parameters such as hematology, blood chemistry, cell

types in the blood, cytokine production and other functional values may also be assessed. In these cases, it may also be important to measure such indirect parameters at the tissue level (e.g. lymphoid organs, liver).

In PK/PD studies it is generally not necessary to include a control group. The values in the blood before the administration of the therapeutic are used as baseline (internal control). Only if the type of expected effects is such as to suggest effects e.g. on specific tissues, it may be necessary to include a control group. In most cases, the animals will be alive at the end of the study.

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

The route of administration of a test substance is determined per study and depends on the nature of the test substance. Administration of the test substance may require sedation in cases in which a gavage is used in combination with an oral regimen or in which intravenous, subcutaneous, intradermal or intramuscular injections are used. Animals can be trained to cooperate if an oral administration does not require gavage and in cases of intramuscular administration.

Blood will be taken regularly after the administration. In the case of PK, these can be multiple small blood samples in a relatively short period of time after the first injection. In the case of pharmacodynamics, where the effect of the candidate drug on biological / immunological processes is determined, larger blood volumes may be required. The total amount of blood collected will not exceed the maximum established within the institute of 1% of the body weight per 4 weeks (and 0.7% max per bleeding).

If it is necessary (< 10% of cases) to measure the presence or effects of the new drug candidate in the tissues e.g. lymphoid organs, liver, the animals will be euthanized.

In some cases, the malaria infection can affect the PK/PD of specific therapeutics, thus requiring the PK/PD study to be carried out on infected animals. When such studies are necessary it may be possible also to assess some initial effect of the therapeutic on the parasite infection. Animals will be infected with the most appropriate simian parasite determined by the scope of the study i.v. or by mosquito bite under sedation. The acquired knowledge on the effect of the therapeutic on the parasite infection may be used to reduce the number of animals needed in a proper assessment of the therapeutic described in appendix 1. If parasitemia is an additional outcome of the study, animals will be trained to voluntarily participate in thigh prick procedures (small blood volumes). Treatment of blood stage malaria is performed through i.m. injections with antimalarial drugs. If a monkey is infected with sporozoites of a NHP malaria species that forms hypnozoites, the monkey will receive the standard radical treatment comprising anti-blood stage drugs (i.m. injections) and specific anti-liver stage drugs (oral administration). Animals are trained to cooperate with procedures such as i.m. administrations, oral administration and small blood draws through positive reinforcement training.

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

In a PK and / or PD experiment, in most cases each animal is its own control. Statistical testing takes place by comparing a parameter (usually the amount of test substance in the blood) before and after treatment. The size of a test group is not determined by power analysis but based on experiences from previous studies with a similar therapy. A test group will usually consist of a limited number of animals (n = 2-4 per group), because PK profiles are consistent and usually not very different between individual animals. It is an experience from previous studies that such a limited group size is sufficient. The effect of a therapy on biological processes (PD) comprises several variables and therefore requires a group size of 3 to 5 animals, depending on the nature of the therapy / therapeutic and the outcome parameters. The spread between animals in the time to primary parasitemia in our experience is very limited: all animals are positive within 2-4 days. If several doses and / or administration routes per drug are tested in the same experiment, often 2 animals per group will suffice. The number of animals per group will be submitted to the IvD for approval per study.

B. The animals

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

Rhesus monkeys (*Macaca mulatta)*, adult, male and female. These animals will be used in the PK/PD studies. The specific parasite used will depend on the therapeutic to be tested e.g. models of specific disease presentations will be used depending on the expected mechanism of action of the therapeutic. A maximum of 15 animals will be used in 5 years for PK/PD studies. The animals will be coming from the institute's own colony. Estimated number of studies: n=2; estimated number of groups 3-4; estimated number of animals per group n=2-4. As you can see from the low number of animals requested, we expect a very low number of PK/PD studies. In relative terms, we expect that even fewer vaccines or adjunct therapies (immune therapy or other host directed therapies) will be tested in marmosets. In the cases in which vaccines or adjunct therapies will need to be tested in marmosets we expect to be able to extrapolate dose and possibly frequency from previous studies, other species, comparable compounds. We do not expect to test any vaccines or adjunct therapies in cynomolgus monkeys.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals to be used in these experiments, may have been used in other studies. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal frameworks described in art. 1e of the law on animal testing.

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

☒No

☐ Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement. The pharmacokinetics and / or pharmacodynamics are specific for the animal species. If the necessity of testing the efficacy of a new therapeutic in macaques has been established, then it follows automatically from the need to test any pharmacokinetics and / or dynamics in the same animal species. Replacement by a less complex animal species is not relevant in that case.
Physiologically based pharmacokinetic modeling will be applied where possible. This method has not yet been developed for adjunct therapies, such as monoclonal antibodies, cytokines and the like. In collaboration with other units at the institute an attempt will be made to develop this methodology (application is likely to be premature within the timeframe of this project). In the case of biologicals or small molecules that interfere with a specific cascade of the host e.g. sequestration cascade, prior to the PK/PD experiment, it will be explicitly established whether there is cross-reactivity and / or efficacy in this type of test using animal-free *in vitro* methods. Similarly, such assays will be used where necessary for quality control of the candidate drugs.

Reduction. A limited number of animals are used in PK/PD studies and contribute directly to reducing the number of animals in macaque studies of efficacy.

Refinement. We always strive to achieving the best possible PK/PD analysis, while taking the minimum amounts of blood at as few time points as possible. The blood-stage parasitemia of NHP-parasites in rhesus monkeys is reasonably predictable, both in the case of blood stage and sporozoite infections. Through this knowledge, in PD studies, we can restrict the needed thigh pricks to a minimum (in any case in parasite infections that have been used in rhesus monkeys before). Moreover, we are using trained animals (positive reinforcement training), which voluntarily offer their thigh for a prick, after which they receive a reward. This reduces the stress for the animals.

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

The malaria infection itself may give mild malaria symptoms (at higher parasitemia), as for example fever, anaemia, decreased appetite and reduced activity when the parasite ruptures from the infected red blood cell. Animal caretakers check the animals on a daily basis and warn the researcher when needed. The development of the infection is closely monitored and the infection is immediately cured if the above-described symptoms of infection worsen or continue for more than half a day. Human endpoints are determined beforehand to limit the discomfort in unforeseen circumstances. The use of trained animals, as described above, reduces the stress the animals experience during handling.

Environmental effects. Malaria parasites are class 2 organisms and experiments with such parasites are carried out under containment level 2 (DMII and MLII).

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. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☒ No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1>Discomfort from the awakening from sedation
2>Discomfort from frequent fasting
3> PD studies in infected animals: Discomfort from mild malaria symptoms (fever, anaemia)

Explain why these effects may emerge.

1>Awakening from sedation can cause nausea and disorientation
2> Supplementary nutritious and high calorie diet is administered (via esophagus tube) during the period of frequent (daily) fasting.
3> Mild malaria symptoms (fever, anaemia) may occur when the parasites burst out of the red blood cells during the multiplication, in order to infect new red blood cells, as toxic substances are released into the blood that lead to these symptoms.

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

16 hours before sedation animals will have to fasten, to avoid that animals start vomiting on waking up from the sedation.

In general, the symptoms of malaria in most NHP species are very mild at low parasitemia and are therefore hardly observed. Very mild malaria symptoms disappear spontaneously after a few hours, when the red blood cell rupture is over. If animals develop more severe symptoms, the parasitemia is immediately determined and if the parasitemia appears to be exceptionally high (>15%), the animals are immediately cured with chloroquine injections or if the scope of the protocol foresees it, sacrificed. Vit B and iron supplements will be administered i.m. to help the animals recover from anaemia when required.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

☐ No > Continue with question K.

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

If an animal unexpectedly becomes severely sick with an extremely high parasitemia that cannot be treated on time, this will be considered a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative discomfort is classified as moderate. The discomfort is mainly determined by the recovery from anesthesia after the blood tests. If the number of anesthesias is limited, the distress can be estimated as light if necessary. This will be done in consultation with the IvD.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

In some cases, the animals will be sacrificed at the end of a study in order to be able to investigate the biological response to the test substance in tissues e.g. lymphoid organs, liver.

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

16

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: AVD5020020186346

2. Titel van het project: Study of parasite host-interactions and efficacy of new treatment methods in non-human primate malaria models relevant to human malaria infection.

3. Titel van de NTS: Bestudering van ziektemechanismen en de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes in niet-menselijke primaten modellen van humane malaria infecties

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: 31-08-2018
   - ☒ aanvraag compleet: 31-08-2018
   - ☒ in vergadering besproken: 07-09-2018
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☒ termijnonderbreking(en) van 13-09-2018 tot 26-09-2018
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☒ aanpassing aanvraag: 26-09-18-2018
   - ☒ advies aan CCD: 01-10-2018

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

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

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

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

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum: 13-09-2018
   - Gestelde vraag/vragen: Een paar tekstuele wijzingen, verduidelijking van de beschrijving van het directe en uiteindelijke doel, samenhang tussen beschreven subdoelen en bijlages, nadere onderbouwing van de te gebruiken diersoorten, het benodigde aantal dieren en de inschatting van het ongerief.
   - Datum antwoord: 26-09-2018
   - Verstrekt(e) antwoord(en): De tekst is op diverse plaatsen aangepast en de correcte titels van de NTS en het projectvoorstel zijn nu opgenomen in de aanvraag projectvergunning dierproeven. Het doel is nader omschreven in zowel NTS als projectvoorstel. In het projectvoorstel is de samenhang tussen subdoelen en bijlages nader uitgewerkt en worden de redenen voor het gebruik van de verschillende apen soorten nader omschreven. De bijlages zijn aangepast wat betreft onderbouwing van het aantal dieren en ongerief.
   - De antwoorden hebben <u>wel</u> 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 parasitaire pathogenen, vaccin onderzoek, de immunologie, statistische analyse, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming.

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het voorgestelde onderzoek bestaat uit drie subdoelen, te weten 1) het bestuderen van parasiet-gastheer interacties in diverse malaria infectie modellen in niet-humane primaten (NHP) die relevant zijn voor de mens, 2) evaluatie van de immunogeniciteit en effectiviteit van kandidaat vaccins tegen malaria in NHP en 3) evaluatie van de effectiviteit van nieuw ontwikkelde immuuntherapieën of immuun-modulatoire middelen tegen malaria in NHP. Deze studies worden uitgevoerd in resus apen, Java apen (beide beschreven in bijlage 1) of penseel aapjes (beschreven in bijlage 2). Voorafgaand aan de evaluatie van sommige kandidaat therapieën moet eerst de juiste dosering worden vastgesteld middels een PK/PD studie (beschreven in bijlage 3). De keuze voor de diersoort wordt bepaald door de te moduleren humane malaria infectie en het subdoel van het experiment. Testen van kandidaat vaccins (subdoel 2) of immuuntherapieën en immuun-modulatoire middelen tegen malaria (subdoel 3) zal overwegend plaats vinden in resus apen, aangezien dit model daarvoor het best gekarakteriseerd is. Alleen indien de effectiviteit tegen bepaalde malariaparasieten (*P. brasilianum/malariae)* bestudeerd moet worden waarvoor de resus aap geen goed model vormt, zal het experiment in common penseel aapjes worden gedaan. Hiervoor dient eerst het infectie model nader gekarakteriseerd te worden in de penseel aap voor de te testen malariaparasiet. Het bestuderen van parasiet-gastheer interacties zal deels plaats vinden in resus apen (als model voor ziektebeelden met een meer acuut verloop), Java apen (meer chronische beloop) of penseel aapjes. Penseel aapjes zijn nodig als makaken geen goed model vormen voor de te testen malariaparasiet, als intra-vital imaging nodig is of bij bestuderen van bepaalde immuun aspecten waarvoor beenmerg chimeren nodig zijn (alleen bij penseel aapjes worden meestal tweelingen geboren die beenmerg chimeer zijn). De vaccin en therapie evaluatie studies dragen tevens bij aan het identificeren en valideren van biomerkers voor de diverse stadia van de ziekte en het vinden van biomerkers voor protectie. De experimenten beschreven in bijlage 3, namelijk PK/PD studies, zijn nodig voor het testen van kandidaat therapieën in bijlage 1 en 2. De subdoelen sluiten logisch bij het hoofddoel, namelijk het bevorderen van de ontwikkeling van vaccins, vaccinatie strategieën en immuuntherapieën tegen malaria bij de mens. Het verwachte ongerief voor de dieren is duidelijk omschreven en de uitkomsten van de voorgestelde experimenten zijn helder en meetbaar. Het aantal dierproeven is realistisch ingeschat op basis van ervaring van de afgelopen jaren. 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 doelcategorieën, te weten 'fundamenteel onderzoek' en 'translationeel of toegepast onderzoek', sluiten aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag wordt enerzijds onderzoek gedaan naar malaria pathogenese en de invloed van het immuunsysteem en genetische factoren van de gastheer daarop. Daarnaast wordt de effectiviteit van nieuwe vaccin kandidaten, immuuntherapieën en/of immuun-modulatoire middelen tegen malaria onderzocht, hetgeen een grote toegepaste waarde heeft. De kennis verkregen met het onderzoek naar de pathogenese van malaria en de invloed van gastheer factoren hierop kan leiden tot identificatie en validatie van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte. Tevens worden nieuwe wetenschappelijke inzichten verkregen over welke factoren een belangrijke rol spelen bij de malariaparasiet-gastheer interactie, hetgeen mogelijk kan worden toegepast bij de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins tegen malaria.

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 verkrijgen van meer inzicht in de pathogenese van malaria, het verkrijgen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte, het testen van kandidaat vaccins en immuuntherapieën en immuunmodulatoire middelen op effectiviteit tegen malaria. Het uiteindelijke doel is deels om een beter begrip te krijgen van de pathogenese van malaria, het verkrijgen van biomerkers voor ziekteprogressie en bescherming tegen ziekte en het ontwikkelen van een vaccin en nieuwe therapieën tegen malaria. Onderzoek naar pathogenese van malaria en de invloed van genetische factoren bij de mens wordt beperkt door grote verschillen in infectie historie, invloed van omgevingsfactoren en immuun status en is daardoor beter te besturen in de NHP infectie modellen met malaria parasieten die sterk overeenkomen of identiek zijn aan malaria parasieten die de mens infecteren. Kandidaat vaccins en therapieën dienen eerst op effectiviteit en veiligheid getest te worden in dieren alvorens klinische evaluatie kan plaats vinden. De NHP malaria infectie modellen zijn daarvoor essentieel vanwege de grote overeenkomst met de mens wat betreft fysiologie en immuunsysteem en gevoeligheid voor malaria parasieten die identiek zijn of sterk gelijken op de parasieten die de mens infecteren. Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld).* De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op inzicht verkrijgen in de pathogenese van malaria, het verkrijgen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte en het testen van kandidaat vaccins en kandidaat therapieën op effectiviteit tegen malaria en veiligheid zijn: de maatschappij, de te genezen personen, het onderzoeksveld en de proefdieren.

   Het belang voor de samenleving is dat met het beschikbaar komen van een vaccin of nieuwe therapieën en biomerkers malaria infectie voorkomen of beter genezen kan 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.

   Voor mensen die besmet raken met malaria is het beschikbaar komen van nieuwe vaccins en effectieve middelen tegen malaria van groot belang. Voor sommige vormen van malaria is er momenteel maar 1 medicijn beschikbaar. Bovendien is resistentie waargenomen tegen veel van de huidig gebruikte medicijnen. Daarnaast is het beschikbaar komen van een vaccin tegen malaria essentieel voor het beschermen van grote groepen mensen tegen deze parasiet. Het beschikbaar komen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte kan bijdragen aan een betere behandeling van de patiënten.

   Voor het onderzoeksveld is het verkrijgen van nieuwe kennis over de pathogenese van malariaparasiet van groot belang. Deze kennis kan bijdragen aan het ontwikkelen van vaccins en nieuwe therapieën tegen malaria. Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s).

   Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen stress ondervinden, in lichte mate ziek worden en soms enige mate van pijn ondervinden. Naar schatting 70 tot 80% van de dieren zal gedood worden aan het eind van de studie teneinde onderzoek aan de weefsels te kunnen doen.

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. De onderzoeksgroep heeft vele jaren ervaring met experimentele infectie van diverse apen soorten met diverse vormen van malaria, vaccin onderzoek en evaluatie van kandidaat geneesmiddelen. Tevens heeft de onderzoeker veel ervaring met bestuderen van de biologie van de malariaparasiet, door middel van diverse 'omics' technieken.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. Het in bijlage 1 beschreven infectie model is reeds vele malen toegepast en zal leiden tot het verkrijgen van de voor verder onderzoek benodigde resultaten. Het in bijlage 2 beschreven malaria infectie model in penseel aapjes is minder ver ontwikkeld. In de eerste fase van het onderzoek zal dit model nader gekarakteriseerd worden. Binnen het instituut wordt deze diersoort echter wel vaak gebruikt in biomedisch onderzoek en er is veel ervaring met evaluatie van vaccins en kandidaat geneesmiddelen in deze diersoort. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstellingen 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 diersoorten is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met plasmodium soorten die ofwel identiek zijn aan of die een grote gelijkenis vertonen met plasmodium soorten bij de mens. Plasmodium soorten hebben een beperkte host range en de in

de aanvraag beschreven soorten kunnen naast de mens alleen niet humane primaten infecteren. Bovendien vertonen deze diersoorten zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met 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 in niet-humane primaten correct als licht ingeschat voor de parasiet donors. Bij de overige dieren die in vaccin of therapie evaluatiestudies gebruikt worden zal naar schatting bij 50% van de makaken en 80% van de penseel aapjes waarbij in verhouding vaak bloed moet worden afgenomen het ongerief matig zijn. Bij de overige dieren zal het ongerief licht zijn. Het ongerief zal matig zijn voor de PK/PD studies. Het ongerief wordt veroorzaakt door de experimentele technieken, de toegediende vaccins of therapieën 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 en daarmee ernstig ongerief 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 vaccins of therapieën tegen malaria. Deze aantasting is van voorbijgaande aard voor ~20-30% van de dieren, deze dieren worden behandeld tegen de infectie. Ongeveer 70-80% van de dieren zal worden ge-euthanaseerd tijdens het experiment om de weefsels te kunnen onderzoeken. De integriteit van de dieren die voor PK/PD studies worden gebruikt wordt aangetast door de toediening van kandidaat therapieën en frequente bloedafnames en in een aantal gevallen door infectie met malaria. Alleen in enkele gevallen zullen de dieren tijdens het experiment worden gedood om de biologische respons op de test substantie in de weefsels te bestuderen. Voor het merendeel van de dieren is de aantasting van de integriteit van voorbijgaande aard.

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. De malariaparasiet heeft een complexe levenscyclus waarbij diverse weefsels uit de gastheer betrokken zijn. Daarnaast is de interactie met het immuunsysteem van groot belang voor het beloop van de ziekte. Dit complexe systeem is momenteel nog niet goed *in vitro* te modelleren. Er is geen *in vitro* model beschikbaar waarin een immuunrespons kan worden opgewekt, of dat de beschermende werking van vaccins kan meten.

Er kan veel informatie betreffende specificiteit en hoogte van de immuunrespons worden verkregen uit *in vitro* assays die zullen worden uitgevoerd met het materiaal afkomstig van de dieren, maar het gebruik van proefdieren kan nog niet worden overgeslagen. Of een vaccin of een immuuntherapie of immuunmodulatoir middel bescherming kan bieden tegen malaria infectie kan alleen zinvol getest worden in niet humane primaten. Plasmodium soorten hebben een beperkte host range en de in de aanvraag beschreven soorten kunnen naast de mens alleen niet humane primaten infecteren. Bovendien vertonen deze diersoorten zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens. De kennis verkregen uit deze studies kan gebruikt worden als input voor *in silico* modellen, waardoor in toekomstige experimenten minder dieren nodig zullen zijn.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe. Het aantal benodigde dieren voor de *in vivo* evaluatie van de effectiviteit van kandidaat vaccins en immuuntherapieën (bijlage 1 en 2) wordt bepaald met behulp van statische berekeningen. Het aantal dieren dat nodig is voor de PK/PD studies (bijlage 3) is op basis van ervaring uit eerdere studies gekozen en tot een minimum beperkt. Het aantal benodigde dieren is gebaseerd op een realistische aanname betreffende het aantal middelen dat naar verwachting de komende vijf jaar getest zal gaan worden, de opzet van de studies en het geschat aantal dieren per proefgroep.

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 van deze handelingen tijdens de experimenten zullen ervaren. Het aantal bloedafnames kan tot een minimum worden beperkt in geval reeds eerder geteste malaria stammen worden gebruikt, aangezien van deze stammen bekend is wanneer de parasieten in het bloed verschijnen. Sedatie wordt toegepast wanneer geïndiceerd. Bij onverwacht grotere welzijnsaantasting dan voorzien zal een humaan eindpunt 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 zullen dieren van beide geslachten worden gebruikt.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. Bij PK/PD studies zullen de dieren in het overgrote deel van de studies in leven blijven aan het einde van het experiment. Bij de evaluatie van kandidaat vaccins en therapieën zal 70-80% van de dieren worden gedood voor het bestuderen van de weefsels. Een passende dodingsmethode zoals

vermeld in de richtlijn 2010/63/EU zal worden gebruikt om dieren te euthanaseren.

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 verkrijgen van meer inzicht in de pathogenese van malaria, het verkrijgen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte, het testen van kandidaat vaccins en kandidaat therapieën op effectiviteit tegen malaria en het ongerief dat resus en Java apen en penseel aapjes in de beschreven proeven wordt aangedaan? Is het gebruik van deze 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 mogelijk verkrijgen van een vaccin dat bescherming geeft tegen infectie en nieuwe therapieën om malaria te genezen. Daarnaast kan met het beschikbaar komen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte een meer gerichte behandeling worden ontwikkeld, waardoor onnodig medicijn gebruik voorkomen wordt. De voordelen van het beschikbaar komen van een effectief vaccin of nieuwe medicijnen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn binnen de samenleving (minder zieken, minder doden). Bovendien wordt hierdoor de verspreiding van malaria voorkomen. Daarmee is dit onderzoek van groot belang.

   De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de pathogenese van malaria en de rol van genetische factoren en het afweersysteem van de gastheer op verloop van de infectie en ziekte. Deze kennis kan mogelijk bijdragen aan de ontwikkeling van vaccins en betere therapieën tegen malaria. Aangezien er momenteel nog geen afdoend malariavaccin beschikbaar is en er resistentie optreedt tegen de huidig beschikbare medicijnen is deze kennis van groot belang.

   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 van bloedafnames en injecties. De dieren zullen hiervan licht tot matig ongerief ondervinden.

Vele miljoenen mensen lijden aan malaria en dit heeft een grote impact op welzijn en op economische productiviteit. Dit onderzoek kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

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

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

Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat de kennis omtrent pathogenese van malaria en de preklinische evaluatie van kandidaat vaccins en kandidaat therapieën belangrijk is voor het ontwikkelen van vaccins en effectieve medicijnen tegen malaria. Dit onderzoek kan tevens leiden tot het verkrijgen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte, hetgeen kan bijdragen aan het ontwikkelen van een beter op de patiënt afgestemde en effectievere behandeling.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door het feit dat de gebruikte onderzoekmodellen voor een groot deel reeds zijn toegepast. 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 malariaparasieten, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. Naar schatting 70 tot 80% van de dieren zal gedood worden aan het eind van de studie teneinde onderzoek aan de weefsels te kunnen doen.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. De te gebruiken modellen voor *in vitro* analyses zijn deels binnen dit instituut opgezet en reeds eerder toegepast. Dit onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in NHP, aangezien alleen NHP gevoelig zijn voor deze voor de mens relevante vormen van malaria. De keuze voor resus apen, Java apen en penseel aapjes is toegespitst op de te beantwoorden vraagstelling en gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met specifieke malariaparasieten die sterk gelijken of identiek zijn aan de diverse bij de mens voorkomen parasieten. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoorten, 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 (met behulp van positive reinforcement training). Het ongerief is maximaal matig maar kan ook 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.

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 Dierpr 17

Advies aan CCD

B

Datum 20 november 2018

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20186345

Instelling:	Biomedical Primate Research Centre
Onderzoeker:	10.2.e
Project:	Evaluatie van nieuwe behandelmethodes voor de ziekte van Parkinson en parkinson dementie
Aanvraagnummer:	AVD20186345
Betreft:	Nieuwe aanvraag
Categorieën:	Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	11.1

	11.1 [redacted]			
Naam proef	**Diersoort**	**Stam**	**Aantal dieren**	**Herkomst**
3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	volwassen M/V	16	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	volwassen, M/V	7	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**
3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	Volwassen M/V	48	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn **Niet menselijke primaten**

Bijlage 3.4.4.1: 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.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen. / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

- 3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel. / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat: Voor het onderzoek naar de motor symptomen in het MPTP model, kunnen beiden geslachten gebruikt worden. Voor het onderzoek naar Parkinson dementie wordt met voorkeur mannelijke apen gebruikt. Ondanks dat Parkinson dementia evenveel bij mannen als vrouwen voorkomt, is de cognitie gevoelig voor oestrogeen. Door alleen mannelijke dieren in te zetten willen we mogelijke uitkomstvariatie door de menstruatiecyclus minimaliseren [12].
- 3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat: Voor het onderzoek naar de motor symptomen in het MPTP model, kunnen beiden geslachten gebruikt worden. Voor het onderzoek naar Parkinson dementie wordt met voorkeur mannelijke apen gebruikt. Ondanks dat Parkinson dementia evenveel bij mannen als vrouwen voorkomt, is de cognitie gevoelig voor oestrogeen. Door alleen mannelijke dieren in te zetten willen we mogelijke uitkomstvariatie door de menstruatiecyclus minimaliseren [12].

Locatie uitvoering experimenten	10.2.g
Maatschappij	11.1

2 DEC advies

DEC-advies	Citaat C9: De keuze voor een niet humane primaten soort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor inductie van sterk op de ziekte van Parkinson gelijkende verschijnselen en het feit dat het model chronisch is, waardoor het effect van potentiele therapieën op specifieke ziekte symptomen en het verloop van de ziekte bestudeerd kunnen worden, dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld knaagdiermodellen. De specifieke keuze voor de resus aap in plaats van de marmoset betreft enerzijds het testen van therapieën die vanwege de grote specificiteit voor de mens hun aangrijpingspunt niet in de marmoset, maar wel in de resus aap herkennen (door de grotere evolutionaire verwantschap met de mens). Anderzijds betreft het behandelmethodes waarbij specifiek in bepaalde gebieden in de hersenen een injectie moet plaats vinden of elektrodes moeten worden geplaatst. De hersenen van de marmoset zijn te klein om dit nauwkeurig te kunnen doen, vandaar dat voorgesteld wordt dit onderzoek in de grotere resusaap uit te voeren. 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

te testen behandelmethodes 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.

Citaat 14: In dit project worden potentiele nieuwe therapieën tegen de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie geëvalueerd op hun werkzaamheid in resus 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 kunnen de cognitieve veranderingen die kenmerkend zijn voor Parkinson dementie worden gemodelleerd door injectie van ME20.4-saporine in de basale kern van Meynert. Modellen voor de ziekte van Parkinson in andere dieren (muis, kat en rat) zijn wel beschreven maar komen aanzienlijk minder goed overeen met de humane ziekte, zijn niet chronisch en ook de structuur van de hersenen en werking van geneesmiddelen is anders in andere diersoorten. Het marmoset MPTP model vertoont vele overeenkomsten met het resus MPTP model, maar is niet geschikt voor het testen van therapieën die niet kruisreageren met het doel-moleculen in de marmoset (maar wel in de resus aap) of wanneer specifiek bij de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie betrokken hersengebieden moeten worden geïnjecteerd of daar elektrodes in moeten worden aangebracht. Door de experimenten in resus apen 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 lijkt in dit stadium van de ontwikkeling van de potentiele therapieën dan ook niet verantwoord. DBS wordt reeds bij mensen toegepast voor de behandeling van motorische symptomen van de ziekte van Parkinson. Echter voor toepassing van DBS voor behandeling van cognitieve symptomen bij de mens is momenteel onvoldoende kennis aanwezig. Onderzoek in resus apen is nodig om het benodigde stimulatie algoritme en het mogelijk therapeutisch effect te bepalen. Toepassing van DBS zonder deze kennis kan leiden tot tegenovergestelde en dus schadelijke effecten en dit kan daarom niet direct in de mens onderzocht worden.

Citaat C18: Voor het onderzoek naar de ziekte van Parkinson binnen het resus MPTP model zullen zowel mannetjes als vrouwtjes dieren worden gebruikt. Voor het onderzoek naar Parkinson dementie zullen bij voorkeur mannetjes apen worden gebruikt omdat cognitie bij niet humane primaten beïnvloed kan worden door oestrogenen en dat kan een effect hebben op de interindividuele variatie tussen en binnen de dieren. Daarom wordt het gebruik van vrouwtjes in het Parkinson dementie model terecht vermeden.

Citaat C20: Hergebruik zal plaats vinden binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke kwaliteit.

Ethische afweging van de DEC:
Citaat:
1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het evalueren van nieuwe potentiele behandelmethodes tegen de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie in resus apen het ongerief dat deze dieren wordt aangedaan, de aantasting van de integriteit en het doden van de dieren? Is het gebruik van resus apen in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen.

2. De waarde voor de te behandelen personen met de ziekte van Parkinson is gelegen in het mogelijk beschikbaar komen van effectieve behandelmethodes die verergering van de ziekte kunnen voorkomen of de symptomen kunnen verminderen. Tevens worden in deze aanvraag specifiek behandelmethodes tegen Parkinson dementie geëvalueerd en in geval van DBS geoptimaliseerd. Parkinson dementie is een onderzoeksdomein waar pas recentelijk aandacht voor ontstaan is. Het tegengaan van dementie en van de motorische en andere klinische verschijnselen kan een sterke verbetering van de kwaliteit van leven van de betrokken personen en verlichting voor de sociale omgeving inhouden. 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). Daarmee is dit onderzoek van groot belang.

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 of Parkinson dementie en zullen hinder ondervinden door verminderd motorisch en cognitief functioneren. Tevens zullen de dieren operatieve ingrepen ondergaan, voor injectie van een neurotoxine in de basale kern van Meynert, het aanbrengen van elektrodes en het aanbrengen van een transmitter voor telemetrische data acquisitie. Operaties vinden plaats onder anaesthesie. Perioperatief wordt pijnstilling toegepast en worden

antibiotica toegediend. De dieren kunnen enige pijn ondervinden door bloedafnames en injecties. Het ongerief zal matig zijn.

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 de bij Parkinson dementie optredende cognitieve achteruitgang tegen te gaan. In het projectvoorstel staat ook als voorwaarde aangegeven dat de te testen behandelmethode moet bijdragen aan het wetenschappelijk inzicht in de ziekte en dat kan onder meer bereikt worden door de PET studies. Deze kennis is van groot belang voor de verdere ontwikkeling van een gerichtere behandeling van de ziekte.

Indien de doelstellingen behaald worden, zal dit onderzoek bijdragen aan het verkrijgen van nieuwe behandelmethodes waarmee mensen met de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie behandeld kunnen worden. De nieuwe medicijnen dan wel de nieuwe DBS protocollen kunnen ofwel een alternatief vormen voor L-DOPA, waar ernstige bijwerkingen van bekend zijn, ofwel een betere behandeling geven van de niet-motorische verschijnselen van de ziekte van Parkinson, dan wel de geleidelijke achteruitgang in dementie tegengaan. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

3. De DEC concludeert dat de belangen van de samenleving als geheel en die van de patiënten in het bijzonder, welke in dit project worden nagestreefd 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 of behandeling met DBS tegen de verschijnselen van de ziekte van Parkinson en of de daarmee gepaard gaande dementie 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 succesvol toegepast zijn door de onderzoeker in marmosets. Tevens wordt samengewerkt met ervaren neurochirurgen. 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 behandelmethodes, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De studie zal worden uitgevoerd in resus apen

(Macaca mulatta). De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor inductie van Parkinson met MPTP, de mogelijkheid om injecties uit te voeren en elektrodes te plaatsen in specifieke gebieden in het brein 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 van nieuwe behandelmethodes 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 het toepassen van telemetrie waardoor het aantal handelingen verminderd wordt, PET-CT om veranderingen in de hersenen over de tijd te kunnen volgen, zonder dat opofferen van het dier nodig is en training van dieren voor het meten van cognitie en andere gedragstesten. 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
De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over:
Aanvullende argumentatie omtrent de noodzaak om resus apen te gebruiken voor onderzoek naar het therapeutisch effect van DBS op de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie, criteria waaraan kandidaat geneesmiddelen moeten voldoen om in aanmerking te komen voor evaluatie in dit diermodel en of er geen PK/PD studies nodig zou zijn om de juiste dosering en het toedieningsschema te bepalen, aanvullende informatie betreffende proefopzet, de opzet van het in het projectvoorstel vermelde pilot-experiment, de biotechnische handelingen en gedragstesten, de keuze om mannetjes te gebruiken voor onderzoek naar Parkinson dementie en het ongerief.

Citaat: In de tweede vragenronde werd de onderzoeker geïnformeerd dat naar de mening van de DEC DBS voor behandeling van motorische symptomen bij de ziekte van Parkinson reeds uitgebreid bij mensen wordt toegepast en dus niet nader onderzocht hoeft te worden. De DEC was echter wel overtuigd, mede door de door de onderzoeker aangereikte argumenten, van het belang van nader onderzoek in resus apen voor behandeling van Parkinson dementie d.m.v. DBS. Verder werd gevraagd om een nadere omschrijving van de te volgen strategie bij de

	haalbaarheidsstudie (de nieuwe bijlage 2), de geschiktheid van de beschreven gedragstest om cognitieve verstoringen bij Parkinson dementie te meten, nadere uitleg omtrent het aantal proefgroepen bij de therapie evaluatie studies (de nieuwe bijlage 3) en om enkele tekstuele aanpassingen. Op 29-10-2018 werd gevraagd om nadere uitleg over het gebruikte MPTP inductie model. Het projectvoorstel is ingrijpend gewijzigd naar aanleiding van de vragen van de DEC. Het DEC advies is Positief Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
11.1 [redacted]	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	Citaat: De ziekte van Parkinson is een ernstig invaliderende ziekte bij de mens waarvoor op dit moment slechts beperkte behandelingen beschikbaar zijn. Deze behandelingen bestrijden alleen de motorische symptomen en vertonen na verloop van tijd ernstige bijwerkingen. In dit project wordt daarom de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes tegen verschillende aspecten van de ziekte van Parkinson onderzocht in het resusaap Parkinsonmodel. Dit betreft de motorische symptomen, en Parkinson dementie waarbij in Parkinson patienten de cognitie is verstoord. [...] Er is een grote behoefte aan nieuwe farmacologische en niet-farmacologische behandelingen zoals medicijnen tegen PD en deep brain stimulatie als behandeling bij PDD. De resultaten van deze studies worden gebruikt voor selectie van kandidaat geneesmiddelen of voor de optimalisatie van behandelmethodes voor verdere klinische studies. Een potentieel nieuwe behandeling wordt alleen onderzocht in het aapmodel als in andere diermodellen geen ernstige bijwerkingen naar voren gekomen zijn en er aanwijzingen zijn dat de behandeling effectief kan zijn tegen de ziekte van Parkinson. Het concrete doel van dit project is selectie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson en bijkomende aspecten zoals dementie voor verdere klinische studies. Het is de verwachting dat binnen de looptijd van dit project 3 nieuwe methoden onderzocht gaan worden. Het uiteindelijke doel van het onderzoek is dat behandelmethodes 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: Alleen al 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 ouderdomsziekte 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 alleen de motorische 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 en bijwerkingen voor het medicijn en moet de patiënt tussendoor regelmatig overstappen op andere medicijnen. 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 resusaap Parkinsonmodel 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 de behandeling worden ontdekt. Deze informatie is van belang voor het verdere traject van de behandelmethode voor klinisch gebruik. Verder is het onderzoek in de resusaap ook van belang voor het optimaliseren van DBS therapiëen. Dit geldt met name voor het behandelen van de cognitieve achteruitgang bij de ziekte van Parkinson (PDD). Ondanks eerdere positieve preklinische studies, blijkt er geen eenduidig effect op te treden binnen klinische trials/studies. Dit komt door een beperkte preklinische basis voor de translatie naar de kliniek [5]. De dierstudies zijn allen uitgevoerd met gezonde dieren zonder schade aan de NBM. Geen enkele studie heeft de relatie tussen de mate van cholinerge activatie na stimulatie van de NBM en de cognitieve verbetering laten zien. Tevens is er ook niet gekeken naar het stimulatie algoritme van de DBS in relatie tot het beoogde effect. Terwijl er aanwijzingen zijn dat het stimulatie patroon van groot belang is voor het effect. Een verkeerd gekozen stimulatie kan zelfs tot tegenovergestelde schadelijke effecten leiden. Daarom is het nodig om een stap terug te doen naar een preklinische studie om te onderzoeken wat het effect van verschillende stimulatie protocollen is. Dit kan niet in de mens omdat een verkeerd gekozen stimulatie een schadelijke uitwerking kan hebben. Bovendien, zal met het diermodel ook de ernst van de schade (vroege of late fase van de ziekte) in relatie tot het effect van de behandeling worden uitgezocht. Hierdoor kunnen in de toekomst patiënten geselecteert worden voor deze behandeling. Er is op dit moment geen inzicht in de relatie van slaagkans van NBM-DBS in relatie tot de ernst van het klinische beeld.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1

Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	Citaat uit DEC advies: 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. De onderzoeker heeft een grote expertise op het gebied van de ziekte van Parkinson en jarenlange ervaring met onderzoek naar deze ziekte en het evalueren van nieuwe therapieën in het marmoset MPTP model, inclusief het toepassen van geavanceerde uitleessystemen voor neurologische aandoeningen. Alhoewel er binnen het instituut nog niet eerder gewerkt is met het resus MPTP model is er veel ervaring met het gebruik van resus apen in biomedisch onderzoek en is dit model internationaal een veel toegepast en goed gevalideerd model. Dit onderzoek wordt uitgevoerd in samenwerking met ervaren neurochirurgen. 11.1

3V's

Vervanging	
	3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.: Citaat: In veel gevallen wordt een teststof door een externe partij aangeleverd om te testen in het resusaap Parkinson-model. Een therapie kan meteen in het resusaap Parkinson-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 resusaap. Echter wanneer dit niet voldoende informatie oplevert voor een therapie evaluatie in het Parkinson-model, dient er voorafgaand aan een therapie evaluatie (Bijlage 3) eerst een farmacokinetiek en/of dosisbepaling op relevante gedrags biomerkers in de gezonde resusaap gedaan te worden. Op dit moment zijn er geen in vitro modellen (zoals cellijnen, organoïds) beschikbaar voor het resusaap model om de opname, bio-beschikbaarheid etc. van de nieuwe middelen te onderzoeken.

	3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: Citaat: Deze haalbaarheidsstudie is bedoeld voor het optimaliseren en valideren van het MPTP model voor PD en van het saporine model voor PDD in de resusaap (bijlage 3). Daarom vervalt hier het mogelijk gebruik van in vitro methodes of onderzoek in knaagdieren. Het gebruik van het resusaapmodel bij Parkinson-onderzoek is veel toegepast en uitgebreid gevalideerd. Het gebruik van apen bij PD/PDD-onderzoek dient vooral als een preklinische evaluatie van nieuwe therapieën voordat klinische trials in patiënten worden gestart. Aangezien de resusaap een grote aapsoort is, is de resusaap geschikt voor het plaatsen van DBS-elektroden en het aanbrengen van lokale laesies in specifieke kleine hersenkernen.
	3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: 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 functieverlies. 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. Doordat de klinisch relevante Parkinson-symptomen niet spontaan verdwijnen in de aap-modellen voor de ziekte van Parkinson, is de aap 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. Als aap model wordt de marmosetaap, de cynomolgusaap en de resusaap gebruikt binnen dit onderzoeksveld. Het gebruik van het resusaapmodel bij Parkinson-onderzoek is veel toegepast en uitgebreid gevalideerd. Het gebruik van apen bij PD/PDD-onderzoek dient vooral als een preklinische evaluatie van nieuwe therapieën voordat klinische trials in patiënten worden gestart. Aangezien de resusaap een grotere aapsoort is dan de marmosetaap, is de resusaap geschikter voor het plaatsen van

	DBS-elektroden en het aanbrengen van lokale laesies in specifieke kleine hersenkernen. Een soortgelijke studie met DBS in de NBM is eerder toegepast in de resusaap echter in gezonde apen zonder dat dementie-verschijnselen waren geïnduceerd [14]. Onderzoek naar een nieuwe behandeling voor PDD in het resusaapmodel zal de translationele waarde van een therapie verhogen voordat deze wordt toegepast bij Parkinson-patiënten lijdend aan dementie. Dit kan nog niet direct in de mens worden toegepast omdat het optimale frequentiepatroon van de stimulatie nog niet bekend is. Ook is nog niet bekend wat de neveneffecten van verschillende stimulatie algoritmen zijn op de hersenen. Tot nu toe wordt alleen een continue stimulatie met lage frequentie (20-50 Hz) aangeboden. Deze vorm van stimulatie heeft waarschijnlijk een negatief effect [14] waardoor er ook geen eenduidige resultaten gevonden worden. Een klinische trial met 6 patiënten is om deze reden mislukt [15]. Daarom is het nodig om een stap terug te doen naar een preklinische studie om te onderzoeken wat het effect van verschillende stimulatie protocollen is. Dit kan niet in de mens omdat een verkeerd gekozen stimulatie een schadelijke uitwerking kan hebben. Bovendien, zal met het diermodel ook de ernst van de schade (vroege of late fase van de ziekte) in relatie tot het effect van de behandeling worden uitgezocht.
Verminderen	
	3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.: Citaat: Een farmacokinetiek of een dosis bepaling op relevante gedrags biomerkers zal worden gedaan met het minimumaantal dieren dat nodig is. In het algemeen kan zo’n studie met vier dieren volstaan. Het leidt vooral tot vermindering van het aantal dieren in de daaropvolgende Parkinson-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. Waar mogelijk kunnen verschillende doseringen van een teststof in hetzelfde dier worden getest waardoor het aantal dieren minder zal zijn.

	3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: Citaat: Voordat deze Parkinson modellen worden ingezet in studies is het van belang dat de haalbaarheid is onderzocht. Pas bij een positief resultaat (het kunnen induceren van de ziekte van Parkinson of de cognitieve achteruitgang zoals bij de ziekte van Parkinson optreedt), kan een studie worden gestart. Voor de haalbaarheid wordt het uiterst minimaal aantal dieren van n=3 bij het MPTP model en n=4 bij het saporine model, gebruikt. In de feasibility studie van het saporine model wordt eerst met een dier het effect van oplopende doseringen saporine op het effect van acetylcholine afgifte getest. Hierdoor kan daarna preciezer de dosis saporine in de volgende stap met n=3 dieren worden vastgesteld. Door een longitudinale studie over meerdere weken toe te passen waarbij dieren gedurende een langere periode worden gevolgd met behulp van gedragsobservatie en neuroimaging kan het aantal dieren worden beperkt. Het gebruik van in vivo PET-CT-scan zal informatie opleveren over veranderingen in acetylcholine producerende cellen en hun receptoren over de tijd binnen dezelfde dieren. Dit bespaart veel dieren in vergelijking met een conventionele postmortem studie waarbij voor hetzelfde resultaat meer dieren zijn vereist. De gedrags- en PET-CT-scan veranderingen na ziekte inductie worden met de eigen oorspronkelijke performance (nulwaarden) vergeleken. Bovendien leidt het uitvoeren van meerdere verschillende testen in hetzelfde dier tot vermindering van het aantal proefdieren.

	3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: Citaat: Voordat een geneesmiddel 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. Een behandeling wordt daarna verder in de aap onderzocht om de vertaalslag naar de mens te vergroten. Door een longitudinale studie toe te passen waarbij dieren gedurende een langere periode worden gevolgd met behulp van gedrags- en neuroimagingobservatie kan het aantal dieren worden beperkt. Het gebruik van in vivo PET-CT-scan zal informatie opleveren over veranderingen in dopamine en acetylcholine producerende cellen en hun receptoren over de tijd binnen dezelfde dieren. Dit bespaart veel dieren in vergelijking met een conventionele postmortem observatie waarbij voor hetzelfde resultaat meer dieren zijn vereist. Het aantal benodigde dieren wordt per experiment bepaald aan de hand van power-analyse. Het minimaal aantal benodigde dieren zal worden gebruikt. Om het aantal dieren te verminderen wordt voor de selectie van de dieren van tevoren het gedrag van elk dier gemeten, zodat de groepen gelijke basiswaarden vertonen. De gedrags- en PET-CT-scan veranderingen na ziekteinductie en na behandeling worden daarna met de eigen oorspronkelijke performance (nulwaarden) vergeleken. Bovendien leidt het uitvoeren van meerdere verschillende testen in hetzelfde dier tot vermindering van het aantal proefdieren.
Verfijnen	
	3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.: Citaat: De dieren worden getraind om zo veel mogelijk vrijwillig mee te werken aan de experimentele handelingen zoals het geven van een verdoving of teststof toedieningen. De dieren worden altijd sociaal gehouden in een voor de resusaap geschikte, verrijkte omgeving Citaat: 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 wordt sedatie waar mogelijk vermeden.

	3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: Citaat: Voor de resusaap zijn diverse meetsystemen voorhanden om gedragsfuncties te kwantificeren. Deze functies kunnen op een standaard manier worden gemonitord zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Deze metingen kunnen plaatsvinden in de thuiskooi. Een voorbeeld is de 24-uurs activiteit middels een actimeter. Een ander voorbeeld is het meten van de hersenactiviteit (EEG) waarbij een implanteerbare transmitter voor draadloze metingen wordt gebruikt waardoor de aap vrij kan bewegen. De procedure voor het aanbrengen van EEG-elektrodes is in eerdere studies verfijnd, waardoor de uitval van dieren door technische problemen sterk verminderd is [12]. Het gebruik van de PET-CT-scan maakt het mogelijk om veranderingen in de hersenen over de tijd binnen het afzonderlijke dier te kunnen volgen. Hiervoor moest voorheen een dier geëuthanaseerd worden om dit post-mortem histologisch te kunnen meten. Voor het meten van de cognitie worden de apen eerst 'gehabitueerd' aan de opstelling en daarna stapsgewijs voor de taak getraind. Doordat verschillende parameters in hetzelfde dier worden getest, is een nauwkeurigere meting van het effect van een behandeling mogelijk. Dit lijdt tot verfijning en draagt tevens bij tot een nauwkeuriger bepaling van humane eindpunten. Citaat: De dieren worden voor aanvang van de studie getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan biotechnische handelingen zoals het toedienen van een injectie. 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 cognitietaak). Citaat: De operaties vinden plaats onder algehele anesthesie. Na een operatie wordt een postoperatieve herstelperiode van minstens twee weken toegepast. Na een intracraniale injectie wordt na twee weken met behulp van een PET-CT-scan de effectiviteit van de ingreep gecheckt. Analgesie zal pre- en postoperatief worden gegeven. Bovendien zal lokale anesthetica worden toegediend op de plaats van de chirurgische incisie. Als er tijdens dagelijkse algemene observaties tekenen van pijn, ontsteking of infectie zijn, zullen er pijnstillers en/of antibiotica worden gegeven. PET-CT-scan meting vindt plaats onder algehele anesthesie. Citaat: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente dierverzorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag dan wordt de veterinair hiervan op de hoogte gesteld om te beoordelen of ingrijpen nodig is om ongerief tot een minimum te beperken.

	3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: Citaat: Voor de resusaap zijn diverse meetsystemen voorhanden om gedragsfuncties te kwantificeren. Deze functies kunnen op een standaard manier worden gemonitord zonder extra variabele zoals de beïnvloeding van een observator. Deze metingen kunnen plaatsvinden in de thuiskooi. Een voorbeeld is de 24-uurs activiteit en de lichaamstemperatuur middels een implanteerbare transmitter. Een ander voorbeeld is het meten van de hersenactiviteit (EEG), voor het meten van bijvoorbeeld slaap, waarbij eveneens een implanteerbare transmitter voor draadloze metingen wordt gebruikt waardoor de aap vrij kan bewegen. Voor zowel de temperatuur, activiteit als het EEG kan dezelfde transmitter worden gebruikt. De procedure voor het aanbrengen van EEG-elektrodes is in eerdere studies verfijnd, waardoor de uitval van dieren door technische problemen sterk verminderd is [16]. Het gebruik van de PET-CT-scan maakt het mogelijk om veranderingen in de hersenen over de tijd binnen het afzonderlijke dier te kunnen volgen. Hiervoor moest voorheen een dier geëuthaniseerd worden om dit post-mortem histologisch te kunnen meten. Voor het meten van de cognitie worden de apen eerst 'gehabitueerd' aan de opstelling en daarna stapsgewijs voor de taak getraind. Doordat verschillende parameters in hetzelfde dier worden getest, is een nauwkeurigere meting van het effect van een behandeling mogelijk. Dit lijdt tot verfijning en draagt tevens bij tot een nauwkeuriger bepaling van humane eindpunten. Citaat: De dieren worden voor aanvang van de studie getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan invasieve biotechnische handelingen zoals het toedienen van een injectie of het afnemen van bloed. 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 cognitietaak). Citaat: De operaties vinden plaats onder algehele anesthesie. Na een operatie wordt een postoperatieve herstelperiode van minstens twee weken toegepast. Na een intracraniale injectie wordt na twee weken met behulp van een PET-CT-scan de effectiviteit van de ingreep gecheckt. Analgesie zal pre- en postoperatief worden gegeven. Bovendien zal lokale anesthetica worden toegediend op de plaats van de chirurgische incisie. Als er tijdens observaties tekenen van pijn, ontsteking of infectie zijn, zullen er pijnstillers en/of antibiotica worden gegeven. PET-CT-scan meting vindt plaats onder algehele anesthesie. Citaat: Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente dierverzorgers. Mochten er

	veranderingen optreden in gedrag dan wordt de veterinair hiervan op de hoogte gesteld om te beoordelen of ingrijpen nodig is om ongerief tot een minimum te beperken.
3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.: 11.1 .	
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: 11.1	
3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: 11.1	
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde 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.	
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: Citaat: Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaatsvinden 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.	
3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: Zie bijlage 3.4.4.2.	

Naam proef	**Worden de dieren gedood?**	**Doden volgens richtlijn?**
3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		

3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.	HEP: <1%	Citaat: 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.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.	HEP: <5%	Citaat: 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 achtereenvolgende 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 (interesse in de omgeving), immobiliteit, alertheid, tremoractiviteit. Deze symptomen worden gescoord op een schaal van 0 (niet waargenomen), 1 (waargenomen maar onderdeel van normaal gedrag), 2 (waargenomen in een lichte vorm), 3 (duidelijk waargenomen), en 4 (waargenomen in een ernstige vorm).
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	

3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel	HEP: <5 %	Citaat: 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 achtereenvolgende 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 (interesse in de omgeving), immobiliteit, alertheid, tremoractiviteit. Deze symptomen worden gescoord op een schaal van 0 (niet waargenomen), 1 (waargenomen maar onderdeel van normaal gedrag), 2 (waargenomen in een lichte vorm), 3 (duidelijk waargenomen), en 4 (waargenomen in een ernstige vorm).
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

11.1

11.1 [redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

11.1 [redacted]

[redacted]

[redacted]

11.1 [redacted]

18

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020186346

Bijlagen
1

Datum 6 november 2018
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 30 augustus 2018 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development" met aanvraagnummer AVD5020020186346. 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 6 november 2018 tot en met 31 oktober 2023.
De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie
Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie (DEC) 10.2.g Dit advies is ontvangen op 1 oktober 2018. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Nadere vragen aanvrager
Op 26 oktober 2018 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op eventuele overlap met eerder afgegeven vergunningen en de optimalisatie van het marmoset model. 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 oktober 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 93118, 2509 AC 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:
6 november 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020186346

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

i.o.
10.2.g

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 6 november 2018 tot en met 31 oktober 2023, voor het project "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development" met aanvraagnummer AVD5020020186346, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Senior Scientist.
Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 30 augustus 2018
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
   a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 1 oktober 2018;
   b Bijlagen dierproeven
      - 3.4.4.1. Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in macaque models relevant to human malaria, zoals ontvangen op 1 oktober 2018;
      - 3.4.4.2. Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in marmoset models relevant to human malaria, zoals ontvangen op 1 oktober 2018;
      - 3.4.4.3. PK/PD studies in rhesus macaques, zoals ontvangen op 1 oktober 2018;
   c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 1 oktober 2018;
   d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 1 oktober 2018
   e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 30 oktober 2018.

Aanvraagnummer:
AVD5020020186346

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1. Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in macaque models relevant to human malaria			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	85	50,0% Matig 50,0% Licht
	Java-apen (Macaca fascicularis)	40	50,0% Matig 50,0% Licht
3.4.4.2. Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in marmoset models relevant to human malaria			
	Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus)	48	20,0% Matig 80,0% Licht
3.4.4.3. PK/PD studies in rhesus macaques			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	15	100,0% Matig

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 oktober 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:
AVD5020020186346

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.

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

Aanvraagnummer:
AVD5020020186346

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

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD5020020186346

Uw referentie

Bijlagen

Datum 13 november 2018
Betreft Correctie beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte 10.2.e
Op 30 augustus 2018 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development" met aanvraagnummer AVD5020020186346.

Beslissing
Op 6 november 2018 hebben wij u de beschikking en vergunning van uw aanvraag toegezonden. Op 13 november 2018 heeft de contactpersoon contact met ons opgenomen, omdat de titel van het project en de datum waarop de beoordeling achteraf moet worden ingediend niet correct zijn.

De in de vergunning genoemde projecttitel komt overeen met de titel op het originele aanvraagformulier. Op uw verzoek wordt de titel van het project gewijzigd naar de titel genoemd in het projectvoorstel: "Study of parasite host-interactions and efficacy of new treatment methods in non-human primate malaria models relevant to human malaria infection."

De in de vergunning genoemde datum voor indienen van de beoordeling achteraf is een kennelijke verschrijving en kan gecorrigeerd worden naar oktober 2024.

Voor het overige blijft het besluit van 6 november 2018 ongewijzigd.
Deze brief dient u bij uw vergunning te voegen.

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 93118, 2509 AC 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 gegevens in het colofon.

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).

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:
10.2.g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163