



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 50200 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="3">Biomedical Primate Research Centre</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>10.2.e</td><td></td><td></td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td colspan="3">41146967</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Biomedical Primate Research Centre			Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e			KvK-nummer	41146967					
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. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Lange Kleiweg</td><td>161</td></tr><tr><td>Postbus</td><td colspan="2">3306</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>2288 GJ</td><td>Rijswijk</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">10.2.g</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">Stichting Biomedical Primate Research Centre</td></tr></table>	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	
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.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>10.2.e</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td>10.2.g</td></tr><tr><td>Afdeling</td><td colspan="2">10.2.g</td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2">10.2.e</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie		10.2.g	Afdeling	10.2.g		Telefoonnummer			E-mailadres	10.2.e	
(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie		10.2.g															
Afdeling	10.2.g																
Telefoonnummer																	
E-mailadres	10.2.e																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td colspan="2">10.2.g</td></tr><tr><td>Afdeling</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2"></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	10.2.g		Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	10.2.g																
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 01 - 05 - 2019
- Einddatum 30 - 04 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immuno-therapeutics aimed to induce regulatory T-cells.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het pre-klinisch testen in makaken van nieuwe geneesmiddelen voor het vermeerderen en activeren van immuun-cellen die een schadelijke afweerreactie kunnen onderdrukken.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC 10.2.e
- Postadres 10.2.g
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1350 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
 Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- 1bijlage

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.g [redacted]
 Plaats Rijswijk
 Datum 02 - 05 - 2019
 Handtekening 10.2.g [redacted]



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 | Het pre-klinisch testen in makaken van nieuwe geneesmiddelen voor het vermeerderen en activeren van immuun-cellen die een schadelijke afweerreactie kunnen onderdrukken |
| 1.2 Looptijd van het project | 1 mei 2019 tot en met 30 april 2022 |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Afweersysteem, makaken, antilichamen |

2 Categorie van het project

- | | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project. | <input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek |
| | <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek |
| | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie |
| <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid |
| | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort |
| | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding |
| | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek |
| | <input type="checkbox"/> 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) | Ons afweersysteem zorgt ervoor dat ziekteverwekkers tijdig door het lichaam worden herkend en worden opgeruimd. Een belangrijke eigenschap van het afweersysteem is dat het onderscheid kan maken tussen lichaamseigen en lichaamsvreemde moleculen, zodat alleen een afweerreactie plaatsvindt tegen ziekteverwekkers maar niet tegen lichaamseigen moleculen. Soms treedt echter toch een reactie op tegen lichaamseigen moleculen, hetgeen kan leiden tot auto-immuunziektes, zoals bijvoorbeeld multiple sclerose (MS), reumatoïde |
|---|--|

arthritis (RA) en type I diabetes (T1D). Ook kunnen lichaamsvreemde weefsels worden afgestoten, hetgeen een groot probleem is bij orgaantransplantatie.

Bij de behandeling van auto-immuun ziektes en na orgaantransplantatie wordt de afweerreactie onderdrukt met behulp van medicijnen. Veel van de huidige medicijnen hebben echter diverse bijwerkingen en zijn niet erg specifiek. Het afweersysteem bevat echter ook immuun-cellen die juist een remmend effect hebben op de afweerreactie. In deze projectaanvraag wordt geprobeerd om deze cellen specifiek te vermeerderen en te activeren. Hiermee wordt getracht een breed toepasbare therapie te verkrijgen voor behandeling van diverse auto-immuunziektes en om na orgaantransplantatie afstoting te voorkomen.

Een risico van deze nieuwe middelen is dat ook ongewild andere afweercellen sterk gestimuleerd zouden kunnen worden. Hierdoor kan een grote hoeveelheid ontstekingsgerichte stoffen vrijkomen, waardoor orgaanschade en shock zou kunnen optreden. Er zal daarom nauwkeurig worden gelet op mogelijke bijwerkingen.

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

In dit project zal worden bepaald in hoeverre de te testen geneesmiddelen de gewenste vermeerdering en activering van afweer onderdrukkende immuuncellen bewerkstelligen en wordt inzicht verkregen in mogelijke bijwerkingen, zoals ongewenst vrijkomen van ontstekingsgerichte stoffen.

De bijdrage aan het maatschappelijk belang is dat op deze manier een therapie beschikbaar zou kunnen komen die kan worden ingezet bij de behandeling van auto-immuunziektes en transplantatie. Betere behandeling kan leiden tot besparing in de ziektekosten en verbetering van de kwaliteit van leven. De resultaten van deze studies zullen worden gepubliceerd in internationale wetenschappelijke tijdschriften.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

In drie jaar tijd maximaal 30 makaken.

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

De dieren zullen stress ondervinden ten gevolge van biotechnische handelingen en ongerief ten gevolge van de frequente bloedafnames. Eventuele bijwerkingen zullen worden behandeld.

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?

Een deel van de dieren zal mogelijk aan het einde van de studie op humane wijze gedood worden om onderzoek aan de organen te kunnen doen.

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.
- Nieuwe therapieën gericht op het vermeerderen en versterken van regulatoire immuun-cellen zijn eerst gekarakteriseerd met *in vitro* technieken. Om echter de complexe interactie van deze therapieën met alle verschillende immuuncellen goed te kunnen bestuderen is een intact immuunsysteem in een dier noodzakelijk.
- 4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.
- Op basis van de informatie verkregen uit het voorafgaande *in vitro* onderzoek en onderzoek in knaagdieren kan een goede inschatting gemaakt worden van de spreiding van de data en de te gebruiken dosis. Hierdoor zal het aantal dieren per testgroep tot een minimum beperkt worden, en zullen hooguit 2 verschillende doses getest moeten gaan worden.
- 4.3 **Verfijning**
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
- De werking van de nieuwe therapieën is vooraf getest in knaagdieren. Dit is echter vaak alleen mogelijk door gebruik te maken van aan het knaagdier aangepaste moleculen. Hiermee, worden belangrijke inzichten verkregen over de *in vivo* werking en mogelijke risico's van deze therapieën. Echter, de therapeutische moleculen die ook werkelijk in de mens gebruikt gaan worden, kunnen niet in knaagdieren getest worden vanwege de grote verschillen in het afweersysteem en de opbouw van de doelmoleculen. Alleen niet-humane primaten zijn geschikt om werking en bijwerking van deze moleculen afdoende te testen, voorafgaand aan toepassing in de mens. Zowel resus als Java-apen zijn veel gebruikte en geschikte diersoorten voor deze studies, vanwege de grote overeenkomsten met de mens wat betreft het afweersysteem en de mogelijkheid om de afweerreacties in detail te bestuderen.
- Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.
- De dieren zijn sociaal gehuisvest en aan mensen gewend. Ze zijn getraind om zo veel mogelijk mee te werken aan eenvoudige biotechnische handelingen. Dieren worden verdoofd voor meer complexe biotechnische handelingen en krijgen pijnstilling waar nodig. De mogelijk nadelige effecten van vergelijkbare (immuun) therapieën zijn goed bekend en tijdens het experiment wordt hier nauwkeurig naar gekeken en wordt gehandeld om verder ongerief te voorkomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

--



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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

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.

of the primary features of the immune system is its capacity to discriminate between self and non-self molecules. However, inadvertent reactions against self-molecules occurs in some cases and can lead to auto-immune diseases, such as type I diabetes, multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA),

myasthenia gravis (MG), systemic lupus erythematosus (SLE) etc. Furthermore, the immune reaction against non-self molecules will lead to rejection of foreign tissue in organ transplantation. In all these cases immunosuppressive treatment is indicated. Although immunosuppressive drugs are widely used to prevent transplant rejection and for the treatment of autoimmune disease, these drugs typically have a broad immunosuppressive effect leading to serious side effects, such as enhanced susceptibility to infectious disease, enhanced risk for malignancies or unwanted effects on non-immune cells, resulting in toxicity.

Regulatory T-cells in the treatment of disease. Regulatory T-cells (T_{REG}) are essential for suppressing inflammation and for the regulation of immune system activity (1, 2). T_{REG} are characterized by constitutive expression of the transcription factor FOXP3. The critical role of T_{REG} in the development of autoimmunity has been highlighted by the multi-organ autoinflammatory syndrome that develops in FOXP3 deficient mice (3, 4) and the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome seen in humans which harbor mutations in FOXP3 (5, 6). T_{REG} are dependent on the cytokine IL-2 for their survival, proliferation and immune-suppressive function (2).

Many autoimmune and chronic inflammatory disorders, such as systemic lupus erythematosus (SLE), type 1 diabetes (T1D), chronic graft-versus-host disease (cGVHD), multiple sclerosis (MS) and rheumatoid arthritis (RA) feature numerical and/or functional deficiencies in T_{REG} cells associated with defective IL-2 production (7). Along these lines, stimulation and expansion of T_{REG} cells in autoimmune and chronic inflammatory patients has been tested using low dose-IL-2 treatment in SLE (8), steroid-refractory cGVHD (9), hepatitis C-induced cryoglobulinaemic vasculitis (10), and T1D (11). A recent study has further examined low dose-IL-2 treatment across 11 different autoimmune/inflammatory diseases and reported T_{REG} cell-activation in all treated individuals (12).

Although the low-dose IL-2 was well-tolerated and caused T_{REG} cell expansion, the therapeutic use of low-dose IL-2 is hampered by the following limitations: (i) IL-2 is very short-lived *in vivo* (half-life around 7-10 minutes) and requires daily injections; (ii) IL-2 has a very narrow therapeutic window since IL-2 is not selective per se and stimulates both T_{REG} as well as effector lymphocytes, potentially worsening immunopathologies; (iii) higher doses of IL-2 can cause toxic adverse effects leading to pulmonary edema and liver cell damage. In addition, IL-2 can induce cytokine release and vascular leakage syndrome (see below) (1, 2, 13).

These limitations have led to the design of therapeutic mAbs that bind to IL-2. To this end, specific mAbs were developed that, combined with recombinant human IL-2, forms T_{REG}-biased IL-2/anti-IL-2 mAb complexes (briefly IL-2 complexes). As such, these IL-2 complexes resulted in an altered capacity to bind to T_{REG} versus T immune-effector cells for more potent and selective T_{REG} expansion with longer half-life, reducing the frequency of injections significantly. The IL-2 complexes are selective for the trimeric IL-2 receptor (IL-2R) that is constitutively expressed by T_{REG} cells. The trimeric IL-2R consists of IL-2R alpha (CD25), IL-2R beta (CD122) and the common gamma chain (γ c). The selectivity of T_{REG} cell-biased IL-2 complexes is based on the new anti-human IL-2 mAb that binds to very specific sites of IL-2, thus temporarily interfering with the interaction of IL-2 with CD122/CD132. The net result of such interaction is that interference with CD122/CD132 results in the selective and efficient delivery of IL-2 to immune cells expressing high levels of CD25, in particular T_{REG} cells. Injection of IL-2/anti-mouse-IL2 mAb complexes in mice showed that a selective and preferential stimulation of T_{REG} cells over cytotoxic CD8⁺ T and NK cells is induced. (1, 14). These complexes did not show any toxic effects in the mice (15, 16). However, further evaluation of the humanized mAb version is needed in a suitable animal species before it can be tested in human clinical trials.

Evaluation in animal species. MAb that interact with the immune system can induce adverse immune-mediated drug reactions such as infusion reactions, cytokine release syndrome, anaphylaxis, immune-complex-mediated pathology and autoimmunity. Infusion of mAb can result in an anaphylactic shock if IgE responses are triggered or immune-complex deposition occurs. These reactions depend on the presence of pre-existing antibodies against the therapeutic mAb and only rarely occur upon first infusion, but can form a problem after prolonged use. However, an immediate strong release of inflammatory cytokines can be induced by unexpected interactions of the therapeutic mAb with immune-effector cells or via triggering of innate immune cells, such as natural killer (NK) cells and phagocytic cells, or complement, through Fc Receptor (FcR) interactions (17). The ensuing cytokine release syndrome can lead to systemic organ failure and result in death, as observed in a phase I clinical trial where the CD28 superagonist mAb TGN1412, targeted for use against RA, was tested (18). Cytokine release syndromes have also been recorded in mAb therapies targeting CD3, expressed on T-cells, and during IL-2 cytokine therapy (1).

The potential risks associated with mAb immune-therapy in general and T_{REG} inducing mAb therapy in particular, has implications for the pre-clinical evaluation of these therapies. Special emphasis has to be put on the effect on the activation and proliferation as well as function of different immune cell populations. In addition, potential triggering of a cytokine release syndrome has to be considered. This requires testing in suitable *in vitro* and *in vivo* animal models (17). Extensive *in vitro* studies involving immunopharmacology on the appropriate cell types and tissue cross-reactivity studies need to be followed by studies in

appropriate animal species. Differences in target molecule sequence homology, expression pattern and function as well as the use of human or humanized mAb precludes the use of many rodent species and makes it necessary to use non-human primates, such as macaque species, that are more closely related to humans. In addition, the much closer similarity in FcγR expression and innate effector function, which are essential to study FcR mediated adverse events associated with the use of mAb therapy, and homology in immunoglobulin genes (important for studying induction of Ab responses to the therapeutic mAb) makes the use of non-human primates pivotal (19-23). While other species can be used to obtain proof of principle by testing surrogate mAb binding to a homologous target, non-human primates are considered the only relevant species for dose range-finding (DRF) and pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) evaluation before clinical trials can start (17).

3.2 Purpose

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

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

The ultimate goal of this project proposal is to obtain a new therapeutic method, based on the *in vivo* amplification and activation of regulatory T-cells, that can be used for treatment of autoimmune diseases, such as RA, ankylosing spondylitis, psoriasis, MS, SLE, and against organ rejection in transplantation.

The direct aim is to evaluate a newly developed humanised anti-human IL-2 monoclonal antibody (mAb) in combination with recombinant human IL-2, forming T_{REG}-biased IL-2/anti-IL-2 mAb complexes (briefly IL-2 complexes, for their potential to selectively activate and increase the number of T_{REG} in non-human primates and to monitor for unexpected adverse events, such as cytokine release syndrome. Currently, a phase 2 clinical trial with low-dose IL-2 is ongoing in SLE patients. The IL-2-mediated changes in the immune system and disease activity observed in the SLE patients will serve to guide decisions on the suitability of these patients for IL-2 complex therapy.

In addition to SLE, the principle of IL-2 complex-based T_{REG} cell expansion could be extended to diseases currently treated with immunosuppressive drugs, such as other above-mentioned autoimmune and chronic inflammatory disorders, as well as allotransplant-associated immune-pathologies.

Our institute has extensive and long-standing expertise in conducting studies using non-human primates. (24-26). Different immunomodulatory therapies have been evaluated in the context of organ transplantation, RA and MS (24). There is also extensive experience with PK/PD studies that were performed in non-human primates in the context of these therapy evaluation studies (25). The investigators involved have extensive experience with analysis of immune responses, immune-cell phenotyping with particular knowledge on T_{REG} (27), analysis of cytokine responses and monitoring of well-being of the animals, including clinical chemistry and haematology evaluation. There is an in-house pathology department for pathology and immune-histochemical assessment.

3.3 Relevance

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

Medical. Autoimmune, autoinflammatory and transplantation-related pathologies comprise a diverse set of chronic diseases commonly featuring a dysregulation of the immune system with either overt activation of effector cells or reduced activity of regulatory cells. Such often chronic and non-curable diseases have an estimated prevalence of about 3-9% of the population. Treatment is generally based on broad immunosuppression affecting nonspecifically all immune cells, thereby causing significant long-term side effects, including increased susceptibility to severe infections and malignancies. Moreover, treatment efficacies of current immunosuppressive drugs are often insufficient, demonstrating the need for novel therapies. An increasing number of immunomodulatory mAb are either approved or in early-to-late clinical trials for the treatment of chronic inflammatory conditions, autoimmune diseases and organ transplant rejection (17). Their application has led to great improvements in the treatment of RA, psoriasis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, SLE, MS, Crohn's disease, ulcerative colitis (17). However, each therapy has its limitations and is effective against only certain diseases, while being ineffective or even harmful in other cases (17). This spectrum is mostly caused by the fact that most immunomodulatory mAb target specific molecules that are only implicated in certain diseases and not in others. There is a high unmet medical need to develop mAb therapies that are effective against a broader range of inflammatory diseases and could be used either as stand-alone or in support of current mAb therapies to improve efficacy and address problems of anti-idiotypic antibody formation that would lead to loss of efficacy.

18. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med.* 2006;355(10):1018-28. 10.1056/NEJMoa063842
19. Jacobsen FW, Padaki R, Morris AE, Aldrich TL, Armitage RJ, Allen MJ, et al. Molecular and functional characterization of cynomolgus monkey IgG subclasses. *J Immunol.* 2011;186(1):341-9. 10.4049/jimmunol.1001685
20. Barreiro LB, Marioni JC, Blekhman R, Stephens M, Gilad Y. Functional comparison of innate immune signaling pathways in primates. *PLoS Genet.* 2010;6(12):e1001249. 10.1371/journal.pgen.1001249
21. Sanghavi SK, Shankarappa R, Reinhart TA. Genetic analysis of Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) domain sequences from rhesus macaque Toll-like receptors (TLRs) 1-10 reveals high homology to human TLR/TIR sequences. *Immunogenetics.* 2004;56(9):667-74. 10.1007/s00251-004-0734-6
22. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 2004;172(5):2731-8.
23. Hogarth PM, Anania JC, Wines BD. The FcγR of humans and non-human primates and their interaction with IgG: implications for induction of inflammation, resistance to infection and the use of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;382:321-52. 10.1007/978-3-319-07911-0_15

10.2.g

3.4 Research strategy

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

In this project proposal novel strategies to expand and enhance the function of T_{REG} *in vivo* will be evaluated in non-human primates as part of their pre-clinical development trajectory. Strategies are either based on novel stabilized forms of IL-2 or IL-2/mAb complexes that result in preferential activation and expansion of T_{REG} instead of immune-effector cells. Successful compounds with adequate PK/PD properties and no adverse effects will be tested further in animal models of human disease and clinical studies in human volunteers and patients, but these studies are not part of this project license application.

Criteria to select candidates for testing are:

- The therapeutic agent must have been tested in relevant cell cultures for absence of toxicity and *in vitro* efficacy
- The therapeutic agent, or a surrogate mAb binding to a homologous target in case of IL-2/mAb complexes, must have been evaluated in rodent models for immunomodulatory effect and absence of toxicity
- The evaluation in non-human primates is part of the pre-clinical evaluation of the therapeutic agent.

A single combined DRF PK/PD approach will be followed, in which animals will be injected with the therapeutic agent at one or multiple time points and blood is taken to assess drug levels, changes in immune cell number and phenotype, cytokine expression levels and clinical chemistry and hematology parameters. Two to three different doses of the drug will be tested in separate groups of animals, together with a negative control group. The primary study goal is to obtain a selective expansion and activation of T_{REG} cells over the other leucocyte subsets in the absence of adverse events.

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.

The project consists of one type of experiment, namely the evaluation of the therapeutic agent in a DRF PK/PD approach as described under 3.4.1. The selection of the precise agent and doses tested depend on information obtained in preceding *in vitro* evaluation and studies in smaller animal models

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

The proposal uses only one type of study.

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	DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 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.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 1 | DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In this project proposal novel immune-therapeutics that aim to expand and enhance the function of regulatory T-cells (T_{REG}) and which are specifically designed for use in humans, will be evaluated in rhesus macaques as a prerequisite step before further in animal studies of human disease and clinical studies in human volunteers and patient are performed. The experimental setup is chosen to allow determination of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) profile, perform limited dose finding and to monitor for occurrence of adverse events, especially with respect to cytokine release syndrome and pathological changes in organ function. Animals will receive the therapeutic agent by either subcutaneous, intramuscular (at one or multiple sites) or intravenous injection. Blood is taken at multiple time points on the day of the first injection (for PK analysis) and then regularly until the end of the study for; a) PK analysis, b) to study changes in T_{REG} and other leucocyte subset number and activation (for PD analysis), c) release of cytokines in the blood, d) clinical chemistry, e) hematology. The clinical chemistry and hematology analysis will serve to monitor unintended side effects, like changes in liver, kidney function etc. and vascular integrity. Experimental groups are; one control group receiving only vehicle, two to three groups receiving different doses of the therapeutic agent. The control group is needed to be able to correct for the changes induced by sedation alone, for instance on clinical chemistry parameters.

Criteria to select candidates for testing are:

- The therapeutic agent must have been tested in relevant cell cultures for absence of toxicity and *in vitro* efficacy.

- The therapeutic agent, or a surrogate monoclonal antibody (mAb) binding to a homologous target in case of IL-2/mAb complexes, must have been evaluated in rodent models for immunomodulatory effect and absence of toxicity.
- The evaluation in non-human primates is part of the pre-clinical evaluation of the therapeutic agent.

The primary outcome parameters are:

1. Selective increase in the absolute number of T_{REG} (over the other leucocyte subsets) and/or increase in expression of activation and proliferation markers on T_{REG}.

The secondary outcome parameters are:

1. Absent or very limited increase in pro-inflammatory cytokines in the blood.
2. Absent or very limited increase in clinical chemistry values indicative of organ damage or vascular leakage (in access above values induced by the sedation alone).
3. Clinical symptoms
4. Functional characteristics of the *in vivo* expanded T_{REG}

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

The therapeutic agent will be injected either subcutaneously, intramuscularly or intravenously depending on the nature of the compound. Local reactions will be recorded in case of subcutaneous and intramuscular injection. The compound is either given once or multiple times using at least a 1 day interval, with a maximum number of 10 injections. Blood is taken at multiple time points on the day of injection for PK analysis. Subsequently, blood is taken at regular time intervals for PK/PD analysis, cytokine analysis and clinical chemistry and hematology (as described above). 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). Injections and blood draw will be performed under sedation. In case a daily blood draw is required then the animals will receive tube feeding to supplement food intake, which is otherwise reduced because of fasting before sedation. The animals will be monitored for general behavior as well as specific signs for anaphylaxis, including alertness, posture, dehydration, nausea, breathing pattern, temperature increase. A clinical scoring system will be prepared and applied based on these symptoms and used as clinical end-point. At the end of the study, animals will either return to the experimental stock or are humanely euthanized in case full pathology assessment is required.

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

The number of animals per test group will be determined on the basis of experience gained in *in vivo* experiments in rodents and in evaluation of therapeutic mAb in macaques. Our collaborators showed significant increased T_{REG} blood cell counts in a previous study, involving 3 animals per group, where Proleukin treatment was used (P=0.0016 mean +/- SD 16 +/- 5 vs 294 +/- 62, control vs hIL-2, unpaired t-test with equal SD, unpublished data). It is therefore expected that a group size of 3 animals will suffice for the PK/PD analysis and that testing of max two to three doses of the therapeutic agent will provide sufficient information for dose range-finding (DRF) needed for FIH enabling studies. Those latter studies will not be performed at our institute but will be performed by our collaborators of this study.

B. The animals

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

Either *Macaca mulatta* or *Macaca fascicularis* (adult; female or male), 30 animals. Macaques are the animals of choice to evaluate cytokine and mAb based immunomodulatory therapies. The reason is that macaques are phylogenetically closely related to humans to allow sufficient cross recognition of therapeutic agents that are specifically designed to bind human target molecules. Furthermore, the similarity in the cellular composition and functional characteristics of the immune system and physiological responses allows adequate evaluation of PK, desired therapeutic effects as well as potential adverse events.

It is expected that at most four different compounds need to be tested, using two to three doses, with three animals per group. The aim is to test two compounds simultaneously, which makes it possible to share a common vehicle control group. Each study is performed either with all male or all female animals. This is needed because of the known difference in prevalence of autoimmune diseases and the reported difference in percentage of T_{REG} between males and females (1). Typically, a study is comprised of 2 dose groups x 2 test compounds + 1 control group = 5 groups. With 3 animals per group this results in 15 animals per experiment. We expect to perform two experiments over a three-year period (testing 4 new compounds in total); i.e. 30 animals in total.

1. Afshan G, Afzal N, Qureshi S. CD4+CD25(hi) regulatory T cells in healthy males and females mediate gender difference in the prevalence of autoimmune diseases. Clin Lab. 2012;58(5-6):567-71.

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, provided that they did not previously receive immunosuppressive therapy or mAb administration. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal framework described in art. 1 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.

As part of the non-clinical evaluation, cytokine and mAb therapies are first tested in *in vitro* immunopharmacology studies to measure relative cell/antigen specificity of the compound by flow cytometry and cell based assays or competitive immune-assays. In addition, binding to human and animal target tissues will be determined using immunohistochemical techniques. However, further *in vivo* studies are usually needed because the *in vitro* culture procedure, the limited time span of culture of primary immune cells as well as an underrepresentation of the complex multicomponent tissue dependent interactions taking place in the organism make full extrapolation to the human situation rather unprecise. Although rodent models are very valuable for proof of principle studies and to investigate the mechanism of action of new therapeutic agents, they are not suitable to evaluate the efficacy and possible adverse effects of therapeutic agents that are specifically tailored to bind human target molecules or involve human mAb. The only suitable animal model to investigate these aspects are non-human primates that express target molecules that are sufficiently homologous to be recognized and that have the appropriate immunoregulatory molecules and physiology to allow adequate assessment of efficacy and adverse events. Studies to evaluate mAb based immunotherapies are usually performed in macaque species because of their close phylogenetic relationship to humans, their well characterized immune-system and the availability of the required immunological tools.

Reduction.

Only the minimum number of animals needed will be used. Based on preceding experiments in rodents and evaluation of other cytokine and mAb immunomodulatory therapies in macaques, the maximum number of animals per group needed to effectively determine PK/PD characteristics and monitor for inadvertent general immune activation is three animals. Furthermore, we aim to evaluate different doses at the same

time and to include more than one candidate therapeutic, so that a single control group can be used. The control group is needed to correct for effects induced by the vehicle or by the sedation alone.

Refinement.

Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via gavage) when animals need to be daily sedated for blood sampling. The gavage is given during the sedation for a maximum period of five days. This reduces the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving sedation. The number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum. All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, a standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of vascular leakage syndrome (e.g. alertness, posture, dehydration, nausea, breathing pattern, temperature increase).

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for enrichment in our institute.

All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database thus facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relieve the pain, if necessary. Appropriate measures will be taken in case clinical symptoms indicative of vascular leakage syndrome are observed in order to minimize discomfort.

In case a daily blood draw is required then the animals will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.

Regular analysis of haematological and clinical chemistry parameters is part of the experiment. If necessary, judged by the veterinarian, measures will then be taken to treat the animal.

The studies will be performed according the guidelines of the "Wet Milieubeheer", and will cause no adverse effects on the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

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.

Pain relief therapy will be applied when substantial induration is seen at the site of injection. Animals will also receive pain relief therapy if there are any other circumstances that indicate that pain can reasonably be expected to occur or animals show signs of illness indicative of pain. Analgesics known not to interfere with the induction of the treatment will be used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort due to injection
2. Stress because of sedation and recovery
3. Reduced food intake because of frequent blood collection
4. Injection of cytokines or immunomodulatory mAb can cause a cytokine release syndrome leading to vascular leakage.

Explain why these effects may emerge.

1. When the therapeutic agent is given by injection, this can cause local pain and irritation
2. Animals will be repeatedly sedated for delivery of therapeutic agent and blood sampling. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
3. Especially during daily sedation food intake will be reduced.
4. Especially after intravenous injection of therapeutic agent an immediate hyper-immune activation can potentially occur. This risk is increased when the therapeutic agent is given for the second time. Antibodies against the therapeutic agent may also induce anaphylaxis. However, because of the short duration of the experiment this is unlikely.

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

1. Animals will be sedated for delivery of therapeutic agent. Only rarely are strong adverse effects seen. Should granuloma formation be observed, then the animal will be sedated, the wound will be cleaned and analgesics are applied.
2. Recovery of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.
3. Animals will receive tube feeding. This is applied during sedation.
4. Injection of therapeutic agent will be done by a veterinarian. Animals will be monitored closely during recovery and appropriate measures will be taken in case of shock.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Animals are monitored twice daily and a clinical scoring list is used to assess if an animal shows clinical symptoms suggestive of progress to a vascular leakage syndrome. In combination with the clinical chemistry and hematology data this information will be used to assess in consultancy with the veterinarian the likelihood of immediate progress to vascular leakage syndrome. In that case the animal will be euthanized immediately in order to avoid unnecessary suffering and a full necropsy will be performed.

Indicate the likely incidence.

The risk of development of vascular leakage syndrome is very low (<5%). The estimate is based on other studies as well as the *in vitro* and *in vivo* analysis in rodents that is performed before the therapeutic agents will be tested in macaques.

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 total amount of discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the frequent sedation needed for collection of blood.

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.

Animals will be euthanized in case they show signs of vascular leakage syndrome. In addition, animals need to be euthanized for some studies in case full pathological assessment of the tissues is needed for evaluation of possible adverse events. In other cases this is not needed and animals will return to the experimental stock. The decision depends on the target molecule involved and whether it is possible to obtain the required information from other models or not

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

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

**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
AVD5020020197924
Bijlagen
2

Datum 6 mei 2019
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 3 mei 2019. Het gaat om uw project "Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immunotherapeutics aimed to induce regulatory T-cells". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020197924. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

6 mei 2019

Aanvraagnummer:

AVD5020020197924

Datum:
6 mei 2019
Aanvraagnummer:
AVD5020020197924

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50200
Naam instelling of organisatie: Biomedical Primate Research Centre
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 10.2.e
Straat en huisnummer: Lange Kleiweg 161
Postbus: 3306
Postcode en plaats: 2288 GJ RIJSWIJK

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

▪

Datum:
6 mei 2019
Aanvraagnummer:
AVD5020020197924

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 mei 2019
Geplande einddatum: 30 april 2022
Titel project: Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immunotherapeutics aimed to induce regulatory T-cells
Titel niet-technische samenvatting: Het pre-klinisch testen in makaken van nieuwe geneesmiddelen voor het vermeerderen en activeren van immuun-cellen die een schadelijke afweerreactie kunnen onderdrukken
Naam DEC: 10.2.g
Postadres DEC:
E-mailadres DEC:

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.350,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: 10.2.e
Functie: 10.2.g
Plaats: Rijswijk
Datum: 2 mei 2019

Datum:
6 mei 2019
Aanvraagnummer:
AVD5020020197924



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

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

**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
AVD5020020197924
Bijlagen
2

Datum 6 mei 2019
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 6 mei 2019
Vervaldatum: 5 juni 2019
Factuurnummer: 197924

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5020020197924	€ 1.350,00

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.



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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

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.

One of the primary features of the immune system is its capacity to discriminate between self and non-self molecules. However, inadvertent reactions against self-molecules occurs in some cases and can lead to auto-

immune diseases, such as type 1 diabetes (T1D), multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), myasthenia gravis (MG), systemic lupus erythematosus (SLE), ankylosing spondylitis (AS), psoriasis etc. Furthermore, the immune reaction against non-self molecules will lead to rejection of foreign tissue in organ transplantation. In all these cases immunosuppressive treatment is indicated. Although immunosuppressive drugs are widely used to prevent transplant rejection and for the treatment of autoimmune disease, these drugs typically have a broad immunosuppressive effect leading to serious side effects, such as enhanced susceptibility to infectious disease, enhanced risk for malignancies or unwanted effects on non-immune cells, resulting in toxicity.

Regulatory T-cells in the treatment of disease. Regulatory T-cells (T_{REG}) are essential for suppressing inflammation and for the regulation of immune system activity (1, 2). T_{REG} are characterized by constitutive expression of the transcription factor FOXP3. The critical role of T_{REG} in the development of autoimmunity has been highlighted by the multi-organ autoinflammatory syndrome that develops in FOXP3 deficient mice (3, 4) and the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome seen in humans which harbor mutations in FOXP3 (5, 6). T_{REG} are dependent on the cytokine IL-2 for their survival, proliferation and immune-suppressive function (2).

Many autoimmune and chronic inflammatory disorders, such as systemic lupus erythematosus (SLE), type 1 diabetes (T1D), chronic graft-versus-host disease (cGVHD), multiple sclerosis (MS) and rheumatoid arthritis (RA) feature numerical and/or functional deficiencies in T_{REG} cells associated with defective IL-2 production (7). Along these lines, stimulation and expansion of T_{REG} cells in autoimmune and chronic inflammatory patients has been tested using low dose-IL-2 treatment in SLE (8), steroid-refractory cGVHD (9), hepatitis C-induced cryoglobulinaemic vasculitis (10), and T1D (11). A recent study has further examined low dose-IL-2 treatment across 11 different autoimmune/inflammatory diseases and reported T_{REG} cell-activation in all treated individuals (12).

Although the low-dose IL-2 was well-tolerated and caused T_{REG} cell expansion, the therapeutic use of low-dose IL-2 is hampered by the following limitations: (i) IL-2 is very short-lived *in vivo* (half-life around 7-10 minutes) and requires daily injections; (ii) IL-2 has a very narrow therapeutic window since IL-2 is not selective per se and stimulates both T_{REG} as well as effector lymphocytes, potentially worsening immunopathologies; (iii) higher doses of IL-2 can cause toxic adverse effects leading to pulmonary edema and liver cell damage. In addition, IL-2 can induce cytokine release and vascular leakage syndrome (see below) (1, 2, 13).

These limitations have led to the design of therapeutic mAbs that bind to IL-2. To this end, specific mAbs were developed that, combined with recombinant human IL-2, forms T_{REG} -biased IL-2/anti-IL-2 mAb complexes (briefly IL-2 complexes). As such, these IL-2 complexes resulted in an altered capacity to bind to T_{REG} versus T immune-effector cells for more potent and selective T_{REG} expansion with longer half-life, reducing the frequency of injections significantly. The IL-2 complexes are selective for the trimeric IL-2 receptor (IL-2R) that is constitutively expressed by T_{REG} cells. The trimeric IL-2R consists of IL-2R alpha (CD25), IL-2R beta (CD122) and the common gamma chain (γ_c). The selectivity of T_{REG} cell-biased IL-2 complexes is based on the new anti-human IL-2 mAb that binds to very specific sites of IL-2, thus temporarily interfering with the interaction of IL-2 with CD122/CD132. The net result of such interaction is that interference with CD122/CD132 results in the selective and efficient delivery of IL-2 to immune cells expressing high levels of CD25, in particular T_{REG} cells. Injection of IL-2/anti-mouse-IL2 mAb complexes in mice showed that a selective and preferential stimulation of T_{REG} cells over cytotoxic $CD8^+$ T and NK cells is induced. (1, 14). These complexes did not show any toxic effects in the mice (15, 16). However, further evaluation of the humanized mAb version is needed in a suitable animal species before it can be tested in human clinical trials.

Evaluation in animal species. MAb that interact with the immune system can induce adverse immune-mediated drug reactions such as infusion reactions, cytokine release syndrome, anaphylaxis, immune-complex-mediated pathology and autoimmunity. Infusion of mAb can result in an anaphylactic shock if IgE responses are triggered or immune-complex deposition occurs. These reactions depend on the presence of pre-existing antibodies against the therapeutic mAb and only rarely occur upon first infusion, but can form a

problem after prolonged use. However, an immediate strong release of inflammatory cytokines can be induced by unexpected interactions of the therapeutic mAb with immune-effector cells or via triggering of innate immune cells, such as natural killer (NK) cells and phagocytic cells, or complement, through Fc Receptor (FcR) interactions (17). The ensuing cytokine release syndrome can lead to systemic organ failure and result in death, as observed in a phase I clinical trial where the CD28 superagonist mAb TGN1412, targeted for use against RA, was tested (18). Cytokine release syndromes have also been recorded in mAb therapies targeting CD3, expressed on T-cells, and during IL-2 cytokine therapy (1).

The potential risks associated with mAb immune-therapy in general and T_{REG} inducing mAb therapy in particular, has implications for the pre-clinical evaluation of these therapies. Special emphasis has to be put on the effect on the activation and proliferation as well as function of different immune cell populations. In addition, potential triggering of a cytokine release syndrome has to be considered. This requires testing in suitable *in vitro* and *in vivo* animal models (17). Extensive *in vitro* studies involving immunopharmacology on the appropriate cell types and tissue cross-reactivity studies need to be followed by studies in appropriate animal species. Differences in target molecule sequence homology, expression pattern and function as well as the use of human or humanized mAb precludes the use of many rodent species and makes it necessary to use non-human primates, such as macaque species, that are more closely related to humans. In addition, the much closer similarity in FcγR expression and innate effector function, which are essential to study FcR mediated adverse events associated with the use of mAb therapy, and homology in immunoglobulin genes (important for studying induction of Ab responses to the therapeutic mAb) makes the use of non-human primates pivotal (19-23). While other species can be used to obtain proof of principle by testing surrogate mAb binding to a homologous target, non-human primates are considered the only relevant species for dose range-finding (DRF) and pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) evaluation before clinical trials can start (17).

3.2 Purpose

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

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

The ultimate goal of this project proposal is to obtain a new therapeutic method, based on the *in vivo* amplification and activation of regulatory T-cells, that can be used for treatment of autoimmune diseases, such as type I diabetes (T1D), multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), myasthenia gravis (MG), systemic lupus erythematosus (SLE), ankylosing spondylitis (AS), psoriasis and against organ rejection in transplantation.

The direct aim is to evaluate a newly developed humanised anti-human IL-2 monoclonal antibody (mAb) in combination with recombinant human IL-2, forming T_{REG}-biased IL-2/anti-IL-2 mAb complexes (briefly IL-2 complexes), for their potential to selectively activate and increase the number of T_{REG} in non-human primates and to monitor for unexpected adverse events, such as cytokine release syndrome. Currently, a phase 2 clinical trial with low-dose IL-2 is ongoing in SLE patients. The IL-2-mediated changes in the immune system and disease activity observed in the SLE patients will serve to guide decisions on the suitability of these patients for IL-2 complex therapy.

In addition to SLE, the principle of IL-2 complex-based T_{REG} cell expansion could be extended to diseases currently treated with immunosuppressive drugs, such as other above-mentioned autoimmune and chronic inflammatory disorders, as well as allotransplant-associated immune-pathologies.

Our institute has extensive and long-standing expertise in conducting studies using non-human primates. (24-26). Different immunomodulatory therapies have been evaluated in the context of organ transplantation, RA and MS (24). There is also extensive experience with PK/PD studies that were performed in non-human primates in the context of these therapy evaluation studies (25). The investigators involved have extensive experience with analysis of immune responses, immune-cell phenotyping with particular

knowledge on T_{REG} (27), analysis of cytokine responses and monitoring of well-being of the animals, including clinical chemistry and haematology evaluation. There is an in-house pathology department for pathology and immune-histochemical assessment.

3.3 Relevance

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

Medical. Autoimmune, autoinflammatory and transplantation-related pathologies comprise a diverse set of chronic diseases commonly featuring a dysregulation of the immune system with either overt activation of effector cells or reduced activity of regulatory cells. Such often chronic and non-curable diseases have an estimated prevalence of about 3-9% of the population. Treatment is generally based on broad immunosuppression affecting nonspecifically all immune cells, thereby causing significant long-term side effects, including increased susceptibility to severe infections and malignancies. Moreover, treatment efficacies of current immunosuppressive drugs are often insufficient, demonstrating the need for novel therapies. An increasing number of immunomodulatory mAb are either approved or in early-to-late clinical trials for the treatment of chronic inflammatory conditions, autoimmune diseases and organ transplant rejection (17). Their application has led to great improvements in the treatment of MS, RA, SLE, AS, psoriasis psoriatic arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis (17). However, each therapy has its limitations and is effective against only certain diseases, while being ineffective or even harmful in other cases (17). This spectrum is mostly caused by the fact that most immunomodulatory mAb target specific molecules that are only implicated in certain diseases and not in others. There is a high unmet medical need to develop mAb therapies that are effective against a broader range of inflammatory diseases and could be used either as stand-alone or in support of current mAb therapies to improve efficacy and address problems of anti-idiotypic antibody formation that would lead to loss of efficacy.

Societal. The number of people with MS, RA, SLE, Crohn's disease and ulcerative colitis totals to around 300,000 in the Netherlands alone. Therefore, the societal impact of a broadly applicable therapy against these diseases is enormous. Furthermore, T_{REG} therapy can potentially be used to prevent type I diabetes mellitus, when applied in the early inflammatory stages of disease. Since, type I diabetes has life-long consequences and concerns about 100,000 people (in The Netherlands), the economic and societal implications of prevention are considerable.

Scientific. While the underlying principle of using IL-2 targeting mAb to amplify number and function of T_{REG} have already been established in mouse models (14), the **new** results obtained in non-human primates, with mAb generated for use in humans, will be published.

1. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(3):180-90. 10.1038/nri3156
2. Sharabi A, Tsokos MG, Ding Y, Malek TR, Klatzmann D, Tsokos GC. Regulatory T cells in the treatment of disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2018. 10.1038/nrd.2018.148
3. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001;27(1):68-73. 10.1038/83784
4. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-6. 10.1038/ni904
5. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 2001;27(1):18-20. 10.1038/83707
6. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001;27(1):20-1. 10.1038/83713
7. Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(5):283-94. 10.1038/nri3823

8. Humrich JY, von Spee-Mayer C, Siegert E, Alexander T, Hiepe F, Radbruch A, et al. Rapid induction of clinical remission by low-dose interleukin-2 in a patient with refractory SLE. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(4):791-2. 10.1136/annrheumdis-2014-206506
9. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, 3rd, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2055-66. 10.1056/NEJMoa1108188
10. Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2067-77. 10.1056/NEJMoa1105143
11. Rosenzweig M, Churlaud G, Mallone R, Six A, Derian N, Chacara W, et al. Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *J Autoimmun*. 2015;58:48-58. 10.1016/j.jaut.2015.01.001
12. Rosenzweig M, Lorenzon R, Cacoub P, Pham HP, Pitoiset F, El Soufi K, et al. Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(2):209-17. 10.1136/annrheumdis-2018-214229
13. Baker KF, Isaacs JD. Novel therapies for immune-mediated inflammatory diseases: What can we learn from their use in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis? *Ann Rheum Dis*. 2018;77(2):175-87. 10.1136/annrheumdis-2017-211555
14. 10.2.g [REDACTED]
17. Brennan FR, Cauvin A, Tibbitts J, Wolfreys A. Optimized nonclinical safety assessment strategies supporting clinical development of therapeutic monoclonal antibodies targeting inflammatory diseases. *Drug Dev Res*. 2014;75(3):115-61. 10.1002/ddr.21173
18. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*. 2006;355(10):1018-28. 10.1056/NEJMoa063842
19. Jacobsen FW, Padaki R, Morris AE, Aldrich TL, Armitage RJ, Allen MJ, et al. Molecular and functional characterization of cynomolgus monkey IgG subclasses. *J Immunol*. 2011;186(1):341-9. 10.4049/jimmunol.1001685
20. Barreiro LB, Marioni JC, Blekhman R, Stephens M, Gilad Y. Functional comparison of innate immune signaling pathways in primates. *PLoS Genet*. 2010;6(12):e1001249. 10.1371/journal.pgen.1001249
21. Sanghavi SK, Shankarappa R, Reinhart TA. Genetic analysis of Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) domain sequences from rhesus macaque Toll-like receptors (TLRs) 1-10 reveals high homology to human TLR/TIR sequences. *Immunogenetics*. 2004;56(9):667-74. 10.1007/s00251-004-0734-6
22. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004;172(5):2731-8.
23. Hogarth PM, Anania JC, Wines BD. The FcγR of humans and non-human primates and their interaction with IgG: implications for induction of inflammation, resistance to infection and the use of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;382:321-52. 10.1007/978-3-319-07911-0_15
24. 10.2.g [REDACTED]

3.4 Research strategy

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

In this project proposal novel strategies to expand and enhance the function of T_{REG} *in vivo* will be evaluated in non-human primates as part of their pre-clinical development trajectory. Strategies are either based on novel stabilized forms of IL-2 or IL-2/mAb complexes that result in preferential activation and expansion of T_{REG} instead of immune-effector cells. Successful compounds with adequate PK/PD properties and no adverse effects will be tested further in animal models of human disease and clinical studies in human volunteers and patients, but these studies are not part of this project license application.

Criteria to select candidates for testing are:

- The therapeutic agent must have been tested in relevant cell cultures for absence of toxicity and *in vitro* efficacy
- The therapeutic agent, or a surrogate mAb binding to a homologous target in case of IL-2/mAb complexes, must have been evaluated in rodent models for immunomodulatory effect and absence of toxicity
- The evaluation in non-human primates is part of the pre-clinical evaluation of the therapeutic agent.

A single combined DRF PK/PD approach will be followed, in which animals will be injected with the therapeutic agent at one or multiple time points and blood is taken to assess drug levels, changes in immune cell number and phenotype, cytokine expression levels and clinical chemistry and hematology parameters. Two to three different doses of the drug will be tested in separate groups of animals, together with a negative control group. The primary study goal is to obtain a selective expansion and activation of T_{REG} cells over the other leucocyte subsets in the absence of adverse events.

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.

The project consists of one type of experiment, namely the evaluation of the therapeutic agent in a DRF PK/PD approach as described under 3.4.1. The selection of the precise agent and doses tested depend on information obtained in preceding *in vitro* evaluation and studies in smaller animal models

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

The proposal uses only one type of study.

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	DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 1 | DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In this project proposal novel immune-therapeutics that aim to expand and enhance the function of regulatory T-cells (T_{REG}) and which are specifically designed for use in humans, will be evaluated in rhesus macaques as a prerequisite step before further in animal studies of human disease and clinical studies in human volunteers and patient are performed. The experimental setup is chosen to allow determination of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) profile, perform limited dose finding and to monitor for occurrence of adverse events, especially with respect to cytokine release syndrome and pathological changes in organ function. Animals will receive the therapeutic agent by either subcutaneous, intramuscular (at one or multiple sites) or intravenous injection. Blood is taken at multiple time points on the day of the first injection (for PK analysis) and then regularly until the end of the study for; a) PK analysis, b) to study changes in T_{REG} and other leucocyte subset number and activation (for PD analysis), c) release of cytokines in the blood, d) clinical chemistry, e) hematology. The clinical chemistry and hematology analysis will serve to monitor unintended side effects, like changes in liver, kidney function etc. and vascular integrity. **The study duration will be maximum 1 month for the treatment period plus maximum 3 months follow-up.** Experimental groups are; one control group receiving only vehicle, two to three groups receiving different doses of the therapeutic agent. The control group is needed to be able to correct for the changes induced by sedation alone, for instance on clinical chemistry parameters.

Criteria to select candidates for testing are:

- The therapeutic agent must have been tested in relevant cell cultures for absence of toxicity and *in vitro* efficacy.
- The therapeutic agent, or a surrogate monoclonal antibody (mAb) binding to a homologous target in case of IL-2/mAb complexes, must have been evaluated in rodent models for immunomodulatory effect and absence of toxicity.
- The evaluation in non-human primates is part of the pre-clinical evaluation of the therapeutic agent.

The primary outcome parameters are:

1. Selective increase in the absolute number of T_{REG} (over the other leucocyte subsets) and/or increase in expression of activation and proliferation markers on T_{REG}.

The secondary outcome parameters are:

1. Absent or very limited increase in pro-inflammatory cytokines in the blood.
2. Absent or very limited increase in clinical chemistry values indicative of organ damage or vascular leakage (in excess above values induced by the sedation alone).
3. Clinical symptoms
4. Functional characteristics of the *in vivo* expanded T_{REG}

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

The therapeutic agent will be injected either subcutaneously, intramuscularly or intravenously depending on the nature of the compound. Local reactions will be recorded in case of subcutaneous and intramuscular injection. The compound is either given once or multiple times using at least a 1 day interval, with a maximum number of 10 injections. Blood is taken at multiple time points on the day of injection for PK analysis. Subsequently, blood is taken at regular time intervals for PK/PD analysis, cytokine analysis and clinical chemistry and hematology (as described above). 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). Injections and blood draw will be performed under sedation. In case a daily blood draw is required then the animals will receive tube feeding to supplement food intake, which is otherwise reduced because of fasting before sedation. The animals will be monitored for general behavior as well as specific signs for anaphylaxis, including alertness, posture, dehydration, nausea, breathing pattern, temperature increase. A clinical scoring system will be prepared and applied based on these symptoms and used as clinical end-point. At the end of the study, animals will either return to the experimental stock or are humanely euthanized in case full pathology assessment is required.

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

The number of animals per test group will be determined on the basis of experience gained in *in vivo* experiments in rodents and in evaluation of therapeutic mAb in macaques. Our collaborators showed significant increased T_{REG} blood cell counts in a previous study, involving 3 animals per group, where Proleukin treatment was used (P=0.0016 mean +/- SD 16 +/- 5 vs 294 +/- 62, control vs hIL-2, unpaired t-test with equal SD, unpublished data). It is therefore expected that a group size of 3 animals will suffice for the PK/PD analysis and that testing of max two to three doses of the therapeutic agent will provide sufficient information for dose range-finding (DRF) needed for FIH enabling studies. Those latter studies will not be performed at our institute but will be performed by our collaborators of this study.

B. The animals

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

Either *Macaca mulatta* or *Macaca fascicularis* (adult; female or male), 30 animals. Macaques are the animals of choice to evaluate cytokine and mAb based immunomodulatory therapies. The reason is that macaques are phylogenetically closely related to humans to allow sufficient cross recognition of therapeutic agents that

are specifically designed to bind human target molecules. Furthermore, the similarity in the cellular composition and functional characteristics of the immune system and physiological responses allows adequate evaluation of PK, desired therapeutic effects as well as potential adverse events.

It is expected that at most four different compounds need to be tested, using two to three doses, with three animals per group. The aim is to test two compounds simultaneously, which makes it possible to share a common vehicle control group. Each study is performed either with all male or all female animals. This is needed because of the known difference in prevalence of autoimmune diseases and the reported difference in percentage of T_{REG} between males and females (1). Typically, a study is comprised of 2 dose groups x 2 test compounds + 1 control group = 5 groups. With 3 animals per group this results in 15 animals per experiment. We expect to perform two experiments over a three-year period (testing 4 new compounds in total); i.e. 30 animals in total.

1. Afshan G, Afzal N, Qureshi S. CD4+CD25(hi) regulatory T cells in healthy males and females mediate gender difference in the prevalence of autoimmune diseases. Clin Lab. 2012;58(5-6):567-71.

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, provided that they did not previously receive immunosuppressive therapy or mAb administration. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal framework described in art. 1 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.

As part of the non-clinical evaluation, cytokine and mAb therapies are first tested in *in vitro* immunopharmacology studies to measure relative cell/antigen specificity of the compound by flow cytometry and cell based assays or competitive immune-assays. In addition, binding to human and animal target tissues will be determined using immunohistochemical techniques. However, further *in vivo* studies are usually needed because the *in vitro* culture procedure, the limited time span of culture of primary immune cells as well as an underrepresentation of the complex multicomponent tissue dependent interactions taking place in the organism make full extrapolation to the human situation rather unprecise. Although rodent models are very valuable for proof of principle studies and to investigate the mechanism of action of new therapeutic agents, they are not suitable to evaluate the efficacy and possible adverse effects of therapeutic agents that are specifically tailored to bind human target molecules or involve human mAb. The only suitable animal model to investigate these aspects are non-human primates that express target molecules that are sufficiently homologous to be recognized and that have the appropriate immunoregulatory molecules and physiology to allow adequate assessment of efficacy and adverse events. Studies to evaluate mAb based immunotherapies are usually performed in macaque species because of their close phylogenetic relationship to humans, their well characterized immune-system and the availability of the required immunological tools.

Reduction.

Only the minimum number of animals needed will be used. Based on preceding experiments in rodents and evaluation of other cytokine and mAb immunomodulatory therapies in macaques, the maximum number of

animals per group needed to effectively determine PK/PD characteristics and monitor for inadvertent general immune activation is three animals. Furthermore, we aim to evaluate different doses at the same time and to include more than one candidate therapeutic, so that a single control group can be used. The control group is needed to correct for effects induced by the vehicle or by the sedation alone.

Refinement.

Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via gavage) when animals need to be daily sedated for blood sampling. The gavage is given during the sedation for a maximum period of five days. This reduces the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving sedation. The number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum. All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, a standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of vascular leakage syndrome (e.g. dehydration, nausea, breathing pattern, temperature increase).

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for enrichment in our institute.

All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database thus facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relieve the pain, if necessary. Appropriate measures will be taken in case clinical symptoms indicative of vascular leakage syndrome are observed in order to minimize discomfort.

In case a daily blood draw is required then the animals will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.

Regular analysis of haematological and clinical chemistry parameters is part of the experiment. If necessary, judged by the veterinarian, measures will then be taken to treat the animal.

The studies will be performed according the guidelines of the “Wet Milieubeheer”, and will cause no adverse effects on the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

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.

Pain relief therapy will be applied when substantial induration is seen at the site of injection. Animals will also receive pain relief therapy if there are any other circumstances that indicate that pain can reasonably be expected to occur or animals show signs of illness indicative of pain. Analgesics known not to interfere with the **effect** of the **test compound** will be used.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort due to injection
2. Stress because of sedation and recovery
3. Reduced food intake because of frequent blood collection
4. Injection of cytokines or immunomodulatory mAb can cause a cytokine release syndrome leading to vascular leakage.

Explain why these effects may emerge.

1. When the therapeutic agent is given by injection, this can cause local pain and irritation
2. Animals will be repeatedly sedated for delivery of therapeutic agent and blood sampling. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
3. Especially during daily sedation food intake will be reduced.
4. Especially after intravenous injection of therapeutic agent an immediate hyper-immune activation can potentially occur. This risk is increased when the therapeutic agent is given for the second time. Antibodies against the therapeutic agent may also induce anaphylaxis. However, because of the short duration of the experiment this is unlikely.

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

1. Animals will be sedated for delivery of therapeutic agent. Only rarely are strong adverse effects seen. Should granuloma formation be observed, then the animal will be sedated, the wound will be cleaned and analgesics are applied.
2. Recovery of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.
3. Animals will receive tube feeding. This is applied during sedation.
4. Injection of therapeutic agent will be done by a veterinarian. Animals will be monitored closely during recovery and appropriate measures will be taken in case of shock.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Animals are monitored twice daily and a clinical scoring list is used to assess if an animal shows clinical symptoms suggestive of progress to a vascular leakage syndrome. In combination with the clinical chemistry and hematology data this information will be used to assess in consultancy with the veterinarian the likelihood of immediate progress to vascular leakage syndrome. In that case the animal will be euthanized immediately in order to avoid unnecessary suffering and a full necropsy will be performed.

Indicate the likely incidence.

The risk of development of vascular leakage syndrome is very low (<5%). The estimate is based on other studies as well as the *in vitro* and *in vivo* analysis in rodents that is performed before the therapeutic agents will be tested in macaques.

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 total amount of discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the frequent sedation needed for collection of blood.

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.

Animals will be euthanized in case they show signs of vascular leakage syndrome. In addition, animals need to be euthanized for some studies in case full pathological assessment of the tissues is needed for evaluation of possible adverse events. **Pathological assessment is indicated in case changes are observed in haematology or clinical chemistry parameters related to tissue damage or when changes to the lymphoid tissue compartment need to be studied.** In other cases this is not needed and animals will return to the experimental stock. The decision depends on the target molecule involved and whether it is possible to obtain the required information from other models or not

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

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: AVD5020020197924
2. Titel van het project: Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immune-therapeutics aimed to induce regulatory T-cells.
3. Titel van de NTS: Het pre-klinisch testen in makaken van nieuwe geneesmiddelen voor het vermeerderen en activeren van immuun-cellen die een schadelijke afweerreactie onderdrukken.
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.g
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 08-05-2019
 - aanvraag compleet: 08-05-2019.
 - in vergadering besproken: 15-05-2019
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 15-05-2019 tot 20-05-2019
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 20-05-2019
 - advies aan CCD: 28-05-2019
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:
 - Gestelde vraag/vragen: wat verduidelijkingen in de tekst en een vraag over de duur van de follow-up na de laatste toediening van de teststof
 - Datum antwoord: 20-05-2019
 - Verstrekt(e) antwoord(en): duur van de follow-up is aangegeven, tekstuele veranderingen zijn doorgevoerd.
 - 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 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. Een van de DEC-leden was betrokken bij de aanvraag en heeft zich tijdens bespreking ervan uit de vergadering teruggetrokken.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. In het voorgestelde project wil men onderzoeken hoe ongewenste immuunreacties op breed toepasbare wijze te onderdrukken zijn door farmacologisch geïnduceerde vermeerdering en activering van regulatoire T-cellen (die betrokken zijn bij de regulatie van de duur en intensiteit van afweerreacties) en wordt gekeken naar mogelijke bijwerkingen van kandidaat geneesmiddelen die dit bewerkstelligen. Het aantal dieren is realistisch in geschat op maximaal 30. Het verwachte

ongerief voor de dieren is duidelijk omschreven en de uitkomsten van deze experimenten zijn helder en meetbaar.

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 biologicals onderzocht op hun kinetische eigenschappen en hun vermogen om ongewenste immuunreacties te onderdrukken/reguleren. Deze kennis kan mogelijk worden toegepast bij de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen auto-immuunziekten of voor het reguleren van afstoting bij orgaantransplantatie.

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 dit experiment is het testen van middelen die selectief regulatoire T-cellen vermeerderen en activeren om te monitoren wat de korte termijn gevolgen daarvan zijn op met name het immuunsysteem in makaken. Het uiteindelijke doel is om deze middelen te gaan toedienen aan mensen met een auto-immuunziekte of na orgaantransplantatie zodat ongewenste immuunreacties beter beheerst worden. 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 moduleren van immuunrespons, zijn: het onderzoeksveld, de proefdieren en de te behandelen patiënten.

Voor het onderzoeksveld is het verkrijgen van nieuwe kennis over regulatie van immuunresponsen van belang. 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 middelen toegediend krijgen waardoor het immuunsysteem verandert en mogelijk aangetast wordt, ze zullen zo vaak als voor de uitvoering van de proeven noodzakelijk wordt geacht gesedeerd worden voor bloedafnames en een aantal dieren zal worden ge-euthanaseerd.

Voor mensen die lijden aan een auto-immuunziekte zijn effectieve middelen van groot belang. Mensen die met deze diagnose geconfronteerd worden hebben veelal een kleine kans op genezing en zijn vaak levenslang gebonden aan middelen die veel bijwerkingen vertonen. De ziekten tasten de kwaliteit van leven aan, vaak ernstig, en bekorten ook de levensverwachting. De bestaande behandelingen zijn ontoereikend en de bijwerkingen omvatten verhoogde kans op infecties en kanker. Ook zal dit type kandidaat medicijnen, welke het onderwerp van de studie zijn, mogelijk toegediend kunnen worden ter betuigeling van afweerreacties na orgaantransplantatie.

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 is evident gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's. Immunologie is een speerpunt van de onderzoekinstelling.
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. Een harde voorwaarde voor testen van kandidaat geneesmiddelen is succesvol voorafgaand *in vitro* onderzoek en onderzoek in knaagdieren van vergelijkbare moleculen die kunnen aangrijpen op knaagdiercellen. Preliminair data uit klinische trials met vergelijkbare middelen geven hoopgevende resultaten. Echter deze middelen zijn kortwerkend en een nieuwe aanpak is vereist om langdurige effecten op het immuunsysteem te verkrijgen.

Welzijn dieren

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

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

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de overeenkomst in zowel het target molecuul van het therapeutisch agens dat getest moet worden als het immuunsysteem tussen makaken en mensen. De biologicals hebben een diersoort specifieke werking en de muizen-equivalent van deze stoffen is niet werkzaam bij primaten. De overeenkomst tussen de immuunsystemen van makaken en mensen is zodanig dat mogelijke positieve en negatieve effecten van behandeling met de menselijke varianten van het biological alleen onderzocht kunnen worden in niet-humane primaten en ook voor het bepalen van de dosering die veilig is in mensen is het gebruik van primaten essentieel.

Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt, tenzij het immuunsysteem door voorgaande behandelingen is gemodificeerd.

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. Dieren zullen op gepaste wijze verzorgd en gehuisvest worden, voldoende aan de wettelijke richtlijnen.
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. Die dieren worden regelmatig gesedeerd voor toediening van de teststof en/of bloedafnames. Door geven van sondevoeding wordt het dierenwelzijn rondom de experimenten gewaarborgd. De effecten van de teststoffen leiden naar verwachting niet tot significant extra ongerief.
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 behandelen met geneesmiddelen die het immuunsysteem kunnen aantasten, door herhaalde sedaties en ook omdat een deel van de dieren zal worden ge-euthanaseerd.
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe. De humane eindpunten zijn goed gedefinieerd en de criteria worden gehanteerd op basis van een op de studie gerichte klinische scoringslijst.
14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. In dit project worden middelen getest die erop gericht zijn een specifiek deel van het immuunsysteem te beïnvloeden. Het immuunsysteem is een complex geheel dat nog niet *in vitro* na te bootsen is en om een goed beeld te krijgen van de effecten van deze middelen; de beoogde en de negatieve effecten van deze middelen op het gehele immuunsysteem dienen in een intact dier te worden onderzocht dat qua immuunsysteem zo veel mogelijk op de mens lijkt.
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 wordt realistisch ingeschat. Er worden maximaal 4 middelen getest in 2 tot 3 doseringen per experiment, waarbij onbehandelde controlegroepen zo veel mogelijk tussen proefopzetten worden gedeeld. De groepsgrootte van drie dieren per groep is statistisch onderbouwd.
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. Dieren worden tijdens de eerste fase van de studie waarin ze vaak onder narcose moeten voor bloedafnames en toediening van de teststof bijgevoerd mbv sondevoeding. Bloedafnames en de volumina van bloedafnames worden tot een minimum beperkt. Hematologische en klinisch chemische parameters worden regelmatig bepaald en beoordeeld door een ervaren dierenarts. Dieren worden gedurende de gehele studie gemonitord door ervaren diervverzorgers en een klinische scorelijst wordt bijgehouden waarin de

gezondheid van het dier wordt gerapporteerd. 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., het betreft geen wettelijk vereiste testen en de instelling is betrokken vanwege unieke immunologische expertise en methoden m.b.t. deze diersoorten.

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 kunnen 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, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. Een deel van de dieren zal na afloop van het experiment worden gedood om het effect van de behandeling op organen te evalueren. Euthanasie wordt uitgevoerd volgens de richtlijnen.
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. De dieren die niet gedood worden in het kader van de proef blijven bij de instelling en komen in aanmerking voor hergebruik.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het testen van mogelijke nieuwe immuunsysteem-regulerende medicijnen het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten en het hen aangedane ongerief 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 het onderzoeksveld is vooral gelegen in de identificatie van nieuwe medicijnen die gericht en specifiek de werking van het immuunsysteem kunnen veranderen/reguleren. Als de experimenten succesvol worden afgerond zal er vervolgonderzoek plaatsvinden, onder andere naar werkzaamheid bij relevante ziektebeelden en naar de toepasbaarheid bij mensen. Dit onderzoek vormt een noodzakelijke stap daarheen en is mede bepalend voor eventuele verdere stappen.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, welke worden aangetast ten behoeve van een wetenschappelijk doel en uiteindelijk ontwikkeling van betere geneesmiddelen. Hiervoor worden de dieren verdoofd, teststoffen worden geïnjecteerd en er wordt regelmatig bloed afgenomen. Ook kunnen dieren last hebben van veranderde werking van het immuunsysteem waardoor ze wellicht vatbaarder worden voor infecties. De dieren ondervinden matig ongerief. In uitzonderlijke gevallen zou een anafylactische shock of een cytokine storm kunnen ontstaan. Een dier waarbij dat gebeurt moet zo snel mogelijk worden ge-euthanaseerd om verder ongerief uit te sluiten.

De waarde voor de samenleving is vooral gelegen in de identificatie van middelen die kunnen helpen bij de behandeling van auto-immuunziekten of tegen afstotingsreacties na transplantatie. Dit zijn aandoeningen die de kwaliteit van leven ernstig aantasten en ook de levensverwachting bekorten. Daarmee is dit onderzoek van aanmerkelijk belang omdat de bestaande behandelingen ontoereikend zijn en aanzienlijke bijwerkingen hebben.

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 op langere termijn van groot belang voor mensen, omdat het dringend nodig is om betere middelen met minder bijwerkingen tegen auto-immuunziekten te ontwikkelen en de uitkomst van orgaantransplantatie te verbeteren.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door langdurige ervaring in het werken met niet-humane primaten als proefdier. De aanvrager heeft aantoonbare kundigheid betreffende het opzetten van dierproeven, de analyse van kleine volumina bloedsamples en de werking van het immuunsysteem van niet-humane primaten.

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op fysiologische en moleculaire gelijkenissen tussen mensen en makaken wat betreft de targetmoleculen en de opbouw van het immuunsysteem.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat.

Dit onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in makaken, aangezien deze dieren beter vergelijkbaar zijn met de mens dan andere diermodellen. 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 sedatie, het voortdurend monitoren van de dieren, het delen van controlegroepen en hergebruik van dieren. Het ongerief wordt veroorzaakt door de sedaties, toediening van de teststof, herhaalde bloedafnames en mogelijke veranderingen in het immuunsysteem.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het voorgestelde 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.

10.2.e

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 1 juli 2019 14:49
Aan: 10.2.e
CC: 10.2.e
Onderwerp: Vervolg aanvraag AVD5020020197924

Geachte 10.2.e

Op 3 mei 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immunotherapeutics aimed to induce regulatory T-cells" met aanvraagnummer AVD5020020197924. Hoewel wij het DEC advies reeds op 28 mei hebben ontvangen, is uw aanvraag niet in voorgaande CCD vergadering besproken. De reden hiervoor was dat het ons niet gelukt is om alle aanvragen in de vorige CCD vergadering in te brengen. De keuzes die wij dan maken zijn met name gebaseerd op de doorlooptijden van de lopende vergunningaanvragen.

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:

- U geeft niet aan wat de herkomst van de dieren is die gebruikt zal worden in dit project. Hoewel wij dit wel kunnen raden, willen wij u vragen dit voor de volledigheid nog aan te vullen in uw aanvraag.
- U geeft aan dat de dieren gevestigd worden voordat de dieren worden gesedeerd. Kunt u, wederom voor de volledigheid, aanvullen hoe lang de dieren worden gevestigd?
- Kunt u ook aangeven hoe u het meermaals vasten van de dieren heeft meegewogen in uw ongriefsinschatting?

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Indien u uiterlijk donderdag 4 juli kunt reageren, kunnen wij uw antwoorden mondeling inbrengen in de vergadering.

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,

10.2.e

Medewerker behandelen en ontwikkelen
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

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

Vragen omtrent aanvraag projectvergunning dierproeven AVD5020020197924

Datum: 1 juli 2019

Geachte leden van de CCD,

Hieronder vindt u de aanvullende informatie zoals in de mail van 1 juli 2019 gevraagd. In *italic* de vragen van de CCD.

1. *U geeft niet aan wat de herkomst van de dieren is die gebruikt zal worden in dit project. Hoewel wij dit wel kunnen raden, willen wij u vragen dit voor de volledigheid nog aan te vullen in uw aanvraag.*
De dieren die in deze aanvraag gebruikt zullen worden zijn alle afkomstig uit het BPRC. Het zijn dieren die voortkomen uit een kolonie van dieren die reeds een aantal generaties zijn gefokt op het BPRC.
2. *U geeft aan dat de dieren gevestigd worden voordat de dieren worden gesedeerd. Kunt u, wederom voor de volledigheid, aanvullen hoe lang de dieren worden gevestigd?*
Dieren die gesedeerd moeten worden, worden op de voorafgaande dag gevestigd vanaf 17:00. Handelingen en dus sedatie vinden vrijwel altijd plaats voor 12:00. De dieren mogen dan weer eten vanaf 3-4 uur na sedatie.
3. *Kunt u ook aangeven hoe u het meermaals vasten van de dieren heeft meegewogen in uw ongeriefsinschatting?*
Zowel de injectie op zichzelf als het afnemen van een gering bloedvolume op enkele tijdstippen wordt als "licht" ongerief aangemerkt. Bij frequente sedatie over een korte periode wordt het ongerief ingeschaald als "matig". Dit vanwege enerzijds de beperktere mogelijkheid tot voedselinname en anderzijds vanwege het grotere aantal handelingen. Indien nodig en op aangeven van de dierenarts kan een eventueel tekort aan voedselinname gecompenseerd worden door toediening van vloeibaar voedsel, zoals ook aangegeven in de oorspronkelijke aanvraag.



Advies aan CCD

B

Datum 08 juli 2019
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20197924

Instelling: Biomedical Primate Research Centre
Onderzoeker: 10.2.e
Project: Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immunotherapeutics aimed to induce regulatory T-cells
Aanvraagnummer: AVD20197924
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	De aanvrager wordt voor de volledigheid nog de volgende vragen gesteld: - U geeft niet aan wat de herkomst van de dieren is die gebruikt zal worden in dit project. Hoewel wij dit wel kunnen raden, willen wij u vragen dit voor de volledigheid nog aan te vullen in uw aanvraag. - U geeft aan dat de dieren gevestigd worden voordat de dieren worden gesedeerd. Kunt u, wederom voor de volledigheid, aanvullen hoe lang de dieren worden gevestigd? - Kunt u ook aangeven hoe u het meermaals vasten van de dieren heeft meegewogen in uw ongriefsinschatting?			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates				
	Andere soorten niet-menselijke primaten (andere soorten Ceboidea en Cercopithecoidea)	Macaca mulatta of Macaca fascicularis	30	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Niet menselijke primaten

Voor elke keer dat de dieren gesedeerd worden voor bloedafnames, worden de dieren gevestigd. Dit kan dagelijks zijn.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates / Andere soorten niet-menselijke primaten (andere

soorten Ceboidea en Cercopithecoidea): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat: Each study is performed either with all male or all female animals. This is needed because of the known difference in prevalence of autoimmune diseases and the reported difference in percentage of TREG between males and females (1).

Locatie uitvoering experimenten	10.2.g
Maatschappij	11.1

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C8: ...Een harde voorwaarde voor testen van kandidaat geneesmiddelen is succesvol voorafgaand in vitro onderzoek en onderzoek in knaagdieren van vergelijkbare moleculen die kunnen aangrijpen op knaagdiercellen. Preliminare data uit klinische trials met vergelijkbare middelen geven hoopgevende resultaten. Echter deze middelen zijn kortwerkend en een nieuwe aanpak is vereist om langdurige effecten op het immuunsysteem te verkrijgen.</p> <p>Citaat C9: De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de overeenkomst in zowel het target molecuul van het therapeutisch agens dat getest moet worden als het immuunsysteem tussen makaken en mensen. De biologicals hebben een diersoort specifieke werking en de muizen-equivalent van deze stoffen is niet werkzaam bij primaten. De overeenkomst tussen de immuunsystemen van makaken en mensen is zodanig dat mogelijke positieve en negatieve effecten van behandeling met de menselijke varianten van het biological alleen onderzocht kunnen worden in niet-humane primaten en ook voor het bepalen van de dosering die veilig is in mensen is het gebruik van primaten essentieel. Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt, tenzij het immuunsysteem door voorgaande behandelingen is gemodificeerd. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.</p> <p>Citaat C11: Het ongerief is correct als matig ingeschat. Die dieren worden regelmatig gesedeerd voor toediening van de teststof en/of bloedafnames. Door geven van sondevoeding wordt het dierenwelzijn rondom de experimenten gewaarborgd. De effecten van de teststoffen leiden naar verwachting niet tot significant extra ongerief.</p> <p>Ethische afweging van de DEC:</p>
-------------------	---

Citaat:

1. Rechtvaardigt het testen van mogelijke nieuwe immuunsysteem-regulerende medicijnen het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten en het hen aangedane ongerief 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 het onderzoeksveld is vooral gelegen in de identificatie van nieuwe medicijnen die gericht en specifiek de werking van het immuunsysteem kunnen veranderen/reguleren. Als de experimenten succesvol worden afgerond zal er vervolgonderzoek plaatsvinden, onder andere naar werkzaamheid bij relevante ziektebeelden en naar de toepasbaarheid bij mensen. Dit onderzoek vormt een noodzakelijke stap daarheen en is mede bepalend voor eventuele verdere stappen.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, welke worden aangetast ten behoeve van een wetenschappelijk doel en uiteindelijk ontwikkeling van betere geneesmiddelen. Hiervoor worden de dieren verdoofd, teststoffen worden geïnjecteerd en er wordt regelmatig bloed afgenomen. Ook kunnen dieren last hebben van veranderde werking van het immuunsysteem waardoor ze wellicht vatbaarder worden voor infecties. De dieren ondervinden matig ongerief. In uitzonderlijke gevallen zou een anafylactische shock of een cytokine storm kunnen ontstaan. Een dier waarbij dat gebeurt moet zo snel mogelijk worden ge-euthanaseerd om verder ongerief uit te sluiten.

De waarde voor de samenleving is vooral gelegen in de identificatie van middelen die kunnen helpen bij de behandeling van auto-immuunziekten of tegen afstotingsreacties na transplantatie. Dit zijn aandoeningen die de kwaliteit van leven ernstig aantasten en ook de levensverwachting bekorten. Daarmee is dit onderzoek van aanmerkelijk belang omdat de bestaande behandelingen ontoereikend zijn en aanzienlijke bijwerkingen hebben.

3. 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 op langere termijn van groot belang voor mensen, omdat het dringend nodig is om betere middelen met minder bijwerkingen tegen auto-immuunziekten te ontwikkelen en de uitkomst van orgaantransplantatie te verbeteren.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door langdurige ervaring in het werken met niet-humane primaten als proefdier. De aanvrager heeft aantoonbare kundigheid betreffende het opzetten van dierproeven, de analyse van kleine volumina bloedsamples en de werking van het immuunsysteem van niet-humane primaten. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op fysiologische en moleculaire gelijkenissen tussen mensen en makaken wat betreft de targetmoleculen en de opbouw van het immuunsysteem.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat.

Dit onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in makaken, aangezien deze dieren beter vergelijkbaar zijn met de mens dan andere diermodellen. 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 sedatie, het voortdurend monitoren van de dieren, het delen van controlegroepen en hergebruik van dieren. Het ongerief wordt veroorzaakt door de sedaties, toediening van de teststof, herhaalde bloedafnames en mogelijke veranderingen in het immuunsysteem.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het voorgestelde 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: wat verduidelijkingen in de tekst en een vraag over de duur van de follow-up na de laatste toediening van de teststof

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
11.1	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	<p>Citaat: The ultimate goal of this project proposal is to obtain a new therapeutic method, based on the in vivo amplification and activation of regulatory T-cells, that can be used for treatment of autoimmune diseases, such as type I diabetes (T1D), multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), myasthenia gravis (MG), systemic lupus erythematosus (SLE), ankylosing spondylitis (AS), psoriasis and against organ rejection in transplantation.</p> <p>The direct aim is to evaluate a newly developed humanised anti-human IL-2 monoclonal antibody (mAb) in combination with recombinant human IL-2, forming TREG-biased IL-2/anti-IL-2 mAb complexes (briefly IL-2 complexes), for their potential to selectively activate and increase the number of TREG in non-human primates and to monitor for unexpected adverse events, such as cytokine release syndrome. Currently, a phase 2 clinical trial with low-dose IL-2 is ongoing in SLE patients. The IL-2-mediated changes in the immune system and disease activity observed in the SLE patients will serve to guide decisions on the suitability of these patients for IL-2 complex therapy.</p> <p>In addition to SLE, the principle of IL-2 complex-based TREG cell expansion could be extended to diseases currently treated with immunosuppressive drugs, such as other above-mentioned autoimmune and chronic inflammatory disorders, as well as allotransplant-associated immune-pathologies.</p>
-------------------------------------	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Medical.</p> <p>Autoimmune, autoinflammatory and transplantation-related pathologies comprise a diverse set of chronic diseases commonly featuring a dysregulation of the immune system with either overt activation of effector cells or reduced activity of regulatory cells. Such often chronic and non-curable diseases have an estimated prevalence of about 3-9% of the population. Treatment is generally based on broad immunosuppression affecting nonspecifically all immune cells, thereby causing significant long-term side effects, including increased susceptibility to severe infections and malignancies. Moreover, treatment efficacies of current immunosuppressive drugs are often insufficient, demonstrating the need for novel therapies. An increasing number of immunomodulatory mAb are either approved or in early-to-late clinical trials for the treatment of chronic inflammatory conditions, autoimmune diseases and organ transplant rejection (17). Their application has led to great improvements in the treatment of MS, RA, SLE, AS, psoriasis psoriatic arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis (17). However, each therapy has its limitations and is effective against only certain diseases, while being ineffective or even harmful in other cases (17). This spectrum is mostly caused by the fact that most immunomodulatory mAb target specific molecules that are only implicated in certain diseases and not in others. There is a high unmet medical need to develop mAb therapies that are effective against a broader range of inflammatory diseases and could be used either as stand-alone or in support of current mAb therapies to improve efficacy and address problems of anti-idiotypic antibody formation that would lead to loss of efficacy.</p> <p>Societal.</p> <p>The number of people with MS, RA, SLE, Crohn's disease and ulcerative colitis totals to around 300,000 in the Netherlands alone. Therefore, the societal impact of a broadly applicable therapy against these diseases is enormous. Furthermore, TREG therapy can potentially be used to prevent type I diabetes mellitus, when applied in the early inflammatory stages of disease. Since, type I diabetes has life-long consequences and concerns about 100,000 people (in The Netherlands), the economic and societal implications of prevention are considerable.</p> <p>Scientific.</p> <p>While the underlying principle of using IL-2 targeting mAb to amplify number and function of TREG have already been established in mouse models (14), the new results obtained in non-human primates, with mAb generated for use in humans, will be published.</p>
--	--

Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	De DEC zegt hierover: De kennis en kunde van de onderzoeksgroep is evident gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's. Immunologie is een speerpunt van de onderzoekinstelling. 11.1

3V's

Vervanging	<p>3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates: Citaat: As part of the non-clinical evaluation, cytokine and mAb therapies are first tested in in vitro immunopharmacology studies to measure relative cell/antigen specificity of the compound by flow cytometry and cell based assays or competitive immune-assays. In addition, binding to human and animal target tissues will be determined using immunohistochemical techniques. However, further in vivo studies are usually needed because the in vitro culture procedure, the limited time span of culture of primary immune cells as well as an underrepresentation of the complex multicomponent tissue dependent interactions taking place in the organism make full extrapolation to the human situation rather unprecise. Although rodent models are very valuable for proof of principle studies and to investigate the mechanism of action of new therapeutic agents, they are not suitable to evaluate the efficacy and possible adverse effects of therapeutic agents that are specifically tailored to bind human target molecules or involve human mAb. The only suitable animal model to investigate these aspects are non-human primates that express target molecules that are sufficiently homologous to be recognized and that have the appropriate immunoregulatory molecules and physiology to allow adequate assessment of efficacy and adverse events. Studies to evaluate mAb based immunotherapies are usually performed in macaque species because of their close phylogenetic relationship to humans, their well characterized immune-system and the availability of the required immunological tools.</p>
------------	---

Verminderen

3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates: Citaat: Only the minimum number of animals needed will be used. Based on preceding experiments in rodents and evaluation of other cytokine and mAb immunomodulatory therapies in macaques, the maximum number of animals per group needed to effectively determine PK/PD characteristics and monitor for inadvertent general immune activation is three animals. Furthermore, we aim to evaluate different doses at the same time and to include more than one candidate therapeutic, so that a single control group can be used. The control group is needed to correct for effects induced by the vehicle or by the sedation alone.

Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates: Citaten:Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via gavage) when animals need to be daily sedated for blood sampling. The gavage is given during the sedation for a maximum period of five days. This reduces the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving sedation. The number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum. All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, a standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of vascular leakage syndrome (e.g. dehydration, nausea, breathing pattern, temperature increase).</p> <p>Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for enrichment in our institute.</p> <p>All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database thus facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relief the pain, if necessary. Appropriate measures will be taken in case clinical symptoms indicative of vascular leakage syndrome are observed in order to minimize discomfort.</p> <p>In case a daily blood draw is required then the animals will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.</p> <p>Regular analysis of haematological and clinical chemistry parameters is part of the experiment. If necessary, judged by the veterinarian, measures will then be taken to treat the animal.</p>
3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates: 11.1	
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.

3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates:
 Citaat: Animals to be used in these experiments may have been used in other studies, provided that they did not previously receive immunosuppressive therapy or mAb administration. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal framework described in art. 1 of the law on animal testing.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates	HEP: <5%	Citaat: Animals are monitored twice daily and a clinical scoring list is used to assess if an animal shows clinical symptoms suggestive of progress to a vascular leakage syndrome. In combination with the clinical chemistry and hematology data this information will be used to assess in consultancy with the veterinarian the likelihood of immediate progress to vascular leakage syndrome. In that case the animal will be euthanized immediately in order to avoid unnecessary suffering and a full necropsy will be performed.
Andere soorten niet-menselijke primaten (andere soorten Ceboidea en Cercopithecoidea)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

11.1



[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted text block]



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Biomedical Primate Research Centre

10.2.e

Postbus 3306

2288 GJ RIJSWIJK

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

AVD5020020197924

Bijlagen

1

Datum 8 juli 2019

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e ,

Op 3 mei 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immunotherapeutics aimed to induce regulatory T-cells" met aanvraagnummer AVD5020020197924. 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 8 juli 2019 tot en met 30 april 2022.

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 28 mei 2019. 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.

Datum:
8 juli 2019
Aanvraagnummer:
AVD5020020197924

Nadere vragen aanvrager

Op 1 juli 2019 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op beschrijving van de herkomst van de dieren, beschrijving van de (duur van de) vastenperiode van de dieren en het meewegen van het vasten van de dieren in de ongeriefsclassificatie. 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 en artikel 10a1 lid 3 van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project niet-humane primaten gebruikt worden. Vanwege het gebruik van niet humane primaten is een beoordeling achteraf vereist. Deze beoordeling zal uiterlijk april 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:

8 juli 2019

Aanvraagnummer:

AVD5020020197924

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2.g


Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Biomedical Primate Research Centre

Adres: Postbus 3306

Postcode en plaats: 2288 GJ RIJSWIJK

Deelnemersnummer: 50200

deze projectvergunning voor het tijdvak 8 juli 2019 tot en met 30 april 2022, voor het project "Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immunotherapeutics aimed to induce regulatory T-cells" met aanvraagnummer AVD5020020197924, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.g

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 3 mei 2019
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 28 mei 2019;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates, zoals ontvangen op 28 mei 2019;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 28 mei 2019;
 - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 28 mei 2019
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 1 juli 2019.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates			
	Andere soorten niet-menselijke primaten (andere soorten Ceboidea en Cercopithecoidea) / Macaca mulatta of Macaca fascicularis	30	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 april 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.

Aanvraagnummer:

AVD5020020197924

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.



Aanvraagnummer:

AVD5020020197924

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD5020020197924

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.

Levensloofdossier

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

Niet-menselijke primaten

De Minister heeft een ontheffing verleend volgens artikel 10e lid 7, die het gebruik 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:

AVD5020020197924

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