

Inventaris Wob-verzoek W21-04		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
	Document 9464	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraagformulier (versie 1), d.d. 3 maart 2021				x		x		x	
2	NTS (versie 1)			x						
3	Projectvoorstel (versie 1)				x				x	
4	Bijlage dierproeven 1 (versie 1)				x				x	
5	interne e-mail betreffende ontvangst nieuwe aanvraag, d.d. 3 maart 2020				x				x	
6	E-mail van CCD aan vergunninghouder - begeleidende e-mail bij ontvangstbevestiging, d.d. 3 maart 2020				x		x		x	
7	Ontvangstbevestiging, d.d. 3 maart 2020				x		x		x	
8	E-mail van CCD aan vergunninghouder - kennisgeving van verzending adviesaanvraag naar DEC, d.d. 3 maart 2020				x		x		x	
9	E-mail van CCD aan DEC - eerste e-mail met stukken bij verzoek om advies aan DEC, 3 maart 2020				x				x	
10	E-mail van CCD aan DEC - tweede e-mail met stukken bij verzoek om advies aan DEC, 3 maart 2020				x				x	
11	E-mail van CCD aan DEC - derde e-mail met stukken bij verzoek om advies aan DEC, 3 maart 2020				x				x	
12	E-mail van CCD aan DEC - vierde e-mail met stukken bij verzoek om advies aan DEC, 3 maart 2020				x				x	
13	E-mail van CCD aan DEC - vijfde e-mail met stukken bij verzoek om advies aan DEC, 3 maart 2020				x				x	
14	E-mail van DEC aan CCD - ontvangstbevestiging van adviesaanvraag, d.d. 3 maart 2020				x		x		x	





32	E-mail van vergunninghouder aan CCD - reactie op verzoek aanpassing NTS, d.d. 30 juni 2020				x		x		x	
33	E-mail van CCD aan vergunninghouder - ontvangstbevestiging van aangepaste NTS, d.d. 30 juni 2020				x		x		x	
34	NTS (versie 3)			x						
35	Interne e-mail betreffende correctie op beschikking, d.d. 9 juli 2020			x			x		x	
36	Interne e-mail betreffende bevestiging ondertekening beschikking, d.d. 9 juli 2020			x			x		x	
37	E-mail van DEC aan CCD - begeleidende e-mail bij beschikking, d.d. 9 juli 2020			x			x		x	
38	Beschikking, d.d. 9 juli 2020			x			x		x	
39	E-mail van CCD aan DEC - terugkoppeling over DEC-advies, d.d. 10 juli 2020			x					x	
40	Interne e-mail inzake verzoek tot publicatie NTS, d.d. 10 juli 2020			x			x			
41	NTS (versie 4)	x								





### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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 <b>10.2.g</b>
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie <b>10.2.g</b>
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde <b>10.2.e</b>
		KvK-nummer <b>10.2.g</b>
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer <b>10.2.g</b>
		Postbus <b>10.2.g</b>
		Postcode en plaats <b>10.2.g</b>
		IBAN <b>10.2.g</b>
		Tenaamstelling van het rekeningnummer <b>10.2.g</b>
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters <b>10.2.e</b>
		Functie Unithoofd
		Afdeling Alternatives
		Telefoonnummer <b>10.2.e</b>
		E-mailadres <b>10.2.e</b>
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. Mw.
		Functie
		Afdeling
		Telefoonnummer
		E-mailadres



- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |                |                                     |
|-----------------------------|----------------|-------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters | 10.2.e         | X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | Afdelingshoofd |                                     |
| Afdeling                    | Animal Science |                                     |
| Telefoonnummer              | 10.2.e         |                                     |
| E-mailadres                 | 10.2.e         |                                     |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 04 - 2020 |
| Einddatum  | 01 - 04 - 2025 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Testen van een nieuw, milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Testen van een nieuw adjuvans, met minder of geen bijwerkingen, om auto-immuunziektes van het brein te modelleren in de resus makaak
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                |
|-------------|----------------|
| Naam DEC    | DEC-10.2.g     |
| Postadres   | Postbus 10.2.g |
| E-mailadres | dec@10.2.g     |



## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning C 1187 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- 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.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- bijlage 1, beschrijving dierproeven en bijlage 2, beschrijving MIMyc (+ 2 Sup. Figs)

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	10.2.e
Functie	Adjunct Directeur
Plaats	Rijswijk
Datum	2 - 3 - 2020
Handtekening	10.2.e





## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Het testen van een nieuw adjuvant, met minder of geen bijwerkingen, om auto-immuunziektes van het brein te modelleren in resus apen
1.2 Looptijd van het project	5 jaar; start 01-04-2020 – eind 01-04-2025
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Verfijning, diermodel, ongerief, mild, auto-immuun ziektes

### 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" 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)	<p>Auto-immuunziektes zijn aandoeningen waarbij het eigen lichaam het doelwit vormt van het immuunsysteem. Bekende voorbeelden van auto-immuunziektes zijn diabetes type I, reumatoïde artritis, lupus en multipale sclerose (MS).</p> <p>Gezien de complexiteit van dit soort ziektes, waarbij verschillende typen immuun cellen in het bloed geactiveerd raken en vervolgens in een orgaan schade aanrichten, zijn proefdier modellen nog steeds noodzakelijk om het ziekteproces beter te begrijpen en om medicijnen en therapieën te kunnen testen. Ondanks dat er modellen voor menselijke auto-immuunziektes in knaagdieren opgezet zijn, zijn deze niet voor alle doelstellingen geschikt. Wanneer dit het geval is, wordt er gebruik gemaakt van beter op de mens</p>
---	---



gelijkende modellen in apen, zoals in resus makaken.

Wanneer in makaken auto-immuun ziektes opgewekt worden, zijn zeer sterke hulpstoffen (*adjuvantia*) zoals bijvoorbeeld Compleet Freund's adjuvant (CFA) noodzakelijk om de tolerantie voor lichaamseigen doelwitantigen te doorbreken. Een belangrijk nadeel van CFA is dat het gebruik ervan gepaard kan gaan met ernstige bijwerkingen, zoals onderhuidse ontstekingsreacties. Deze bijwerkingen tasten het welzijn van de dieren aan en zijn mogelijk te voorkomen.

Dit project richt zich op het testen van een nieuw mild adjuvant, met weinig of geen bijwerkingen, om zo onnodig ongerief van de dieren te verminderen.

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Primair doel is het testen van een nieuw, mild adjuvant om daarmee het model voor auto-immuunziekten van het brein in de resus makaak te verfijnen en het ongerief van de dieren te verminderen. De bijwerkingen die het nu nog gebruikte adjuvant (CFA) in de resus makaak veroorzaakt zijn ernstig.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- Maximaal 55 resus makaken voor de gehele looptijd van het project. Het onderzoek is gefaseerd opgebouwd.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- Het te testen adjuvant wordt geformuleerd en, onder narcose, intracutaan op verschillende plaatsen op de rug in kleine hoeveelheid geïnjecteerd. Te verwachten negatieve gevolgen voor het proefdier zijn sufheid en misselijkheid ten gevolge van de narcose. Daarnaast zijn er de ziekteverschijnselen behorend bij het diemodel, bijvoorbeeld het verlies van neurologische functies, waar de dieren last van zullen hebben.
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?
- Het cumulatieve ongerief wordt ingeschat als matig.
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- Alle dieren worden bij het bereiken van het humane eindpunt of aan het einde van het experiment geëuthanaseerd. Om onderzoek te kunnen doen naar de pathologie in het brein en de immunresponsen in de lymfoïde organen is dit noodzakelijk.

#### 4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**  
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.
- De samenstelling van het te testen adjuvant is volledig met behulp van proefdiervrije technologie (bioassays voor aangeboren immunresponsen) tot stand gekomen, en ook de eerste analyses voor het mogelijk veroorzaken van bijwerkingen zijn *in vitro* gedaan.
- We weten ondertussen dat het te testen adjuvant in resus makaken 1) zeer weinig tot geen lokale bijwerkingen geeft en 2) wel immunresponsen stimuleert. We weten nog niet of deze stimulatie ook voldoende is om een auto-immuunziekte te kunnen laten ontstaan, en dat is wel nodig wil het adjuvant CFA kunnen vervangen. Helaas is het nog niet mogelijk om op een proefdiervrije manier auto-immuunziekten na te kunnen bootsen. In het geval van ontstekingen van het brein (zoals bij MS) wordt dit veroorzaakt door complexe interacties tussen het brein en het gehele afweersysteem en zeer waarschijnlijk ook door omgevingsinvloeden en levensstijlen. Bestaande proefdiervrije alternatieven kunnen deze interacties -nog- niet



nabootsen.

**4.2 Vermindering**

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

Het onderzoek wordt gefaseerd opgebouwd met als leidraad het minimaal aantal benodigde dieren om een statistisch significant resultaat te behalen. Daarnaast laten we positieve controlegroepen achterwege (en gebruiken daarvoor historische controles).

**4.3 Verfijning**

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

De belangrijkste doelstelling van dit project is verfijning van een diersmodel voor auto-immuunziekten van het brein in de resus makaak. De noodzaak tot vervanging van CFA is groot in de resus makaak, gezien de heftigheid van de bijwerkingen in deze diersoort. Toch wordt dit model nog met regelmaat en wereldwijd gebruikt waardoor de impact van een nieuw milder adjuvant op dierenwelzijn groot zal zijn.

Ontwikkeling van een bijwerkingsvrij of bijwerkingsarm, maar toch potent, adjuvant zou op termijn mogelijk ook in modellen voor auto-immuunziekten in andere diersoorten (zoals in marmosets, ratten, muizen en cavia's) tot verfijning kunnen leiden alhoewel daarvoor eerst proeven in de betreffende diersoorten nodig zullen zijn.

Tijdens de experimenten wordt onnodig ongerief vermeden door het gebruik van sedatie/pijnstilling.

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

Training van dieren, sedatie en/of narcose, dagelijkse observatie, euthanasie op basis van humane eindpuntcriteria.

**5 In te vullen door de CCD**

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 10.2.g
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in. Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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



- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

### **Auto-immuunziektes**

Auto-immuunziektes vormen een scala aan, vaak chronische, aandoeningen waarbij onderdelen van het eigen lichaam het doelwit vormen van het immuunsysteem. Bekende voorbeelden van auto-immuunziektes zijn coeliakie, diabetes type I, reumatoïde artritis, myasthenia gravis, systemische lupus erythematoses en multipale sclerose (MS). Ondanks dat de afgelopen eeuw tot een sterk toegenomen medische controle over infectieziekten heeft geleid, zijn veel auto-immuunziektes nog maar beperkt behandelbaar en neemt de frequentie van dit soort aandoeningen in met name eerste wereld landen toe. Om deze ziektes beter te leren begrijpen, alsmede om therapeutica in preklinische fases te kunnen testen, zijn goede diermodellen nog steeds onontbeerlijk.

### **MS**

MS is een zeer ernstige, veelal chronische aandoening die de zenuwbanen in het centrale zenuwstelsel (CZS) aantast. De ziekte treft vooral jong volwassenen met een incidentie van 1 op 1000. MS is daarmee na trauma de belangrijkste neurologische ziekte in jong volwassenen. Er zijn circa 17.000 MS patiënten in Nederland en de jaarlijkse kosten voor behandeling en zorg bedragen tussen de 9.000 en 45.000 EUR per patiënt, afhankelijk van de behandeling [1].

De meest voorkomende symptomen zijn ernstige vermoeidheid, tijdelijke blindheid, verminderde mobiliteit, spierzwakte, incontinentie, stijfheid, en onhandigheid en slepen van de benen (meestal asymmetrisch). Uiteindelijk kan de ziekte leiden tot gedeeltelijke of gehele verlamming van de ledematen. Naast motorische problemen ontstaan er ook problemen met geheugen en concentratie, de zogeheten cognitieve problemen [2, 3]. Patiënten met gevorderde MS hebben een sterk verminderde kwaliteit van leven, moeten al snel stoppen met werken en alhoewel MS in het algemeen niet dodelijk is, kunnen MS patiënten wel eerder overlijden als gevolg van infecties, zoals een longontsteking. In ongeveer 80% van de gevallen begint de ziekte met een relapsing-remitting (RR-MS) beloop waarbij episodes met neurologische klachten (relapses) alterneren met gedeeltelijk of zelfs geheel herstel (remissies). Rond de leeftijd van 40 jaar neemt de ziekte meestal een progressief beloop (secundair progressieve MS, SP-MS) en vindt er nauwelijks herstel meer plaats. In een minderheid van de patiënten openbaart de ziekte zich vanaf het begin als progressief (primair progressieve MS, PP-MS). Wat er precies gebeurt bij de overgang van RR naar SP-MS, of welke factoren daar een rol bij spelen is nog onbekend en is een belangrijk onderwerp van onderzoek [4].

Op dit moment zijn er 14 therapieën officieel goedgekeurd voor het behandelen van RR-MS. Dit zijn biologicals als interferon (IFN)-beta en fingolimod en antilichamen die leiden tot B-cel depletie (zoals rituxumab) of die de migratie van lymfocyten naar de hersenen blokkeren (zoals natalizumab). Deze therapieën richten zich op het remmen van de ontstekingsactiviteit van het perifere immuunsysteem, en zijn ook bewezen effectief in de diermodellen voor MS. Het ziektebeloop kan met deze aanpak sterk worden geremd, maar de patiënt kan niet worden genezen aangezien de myeline-laag en de zenuwcellen onherstelbaar beschadigd zijn. De huidige therapieën werken in een deel van de patiënten met RR-MS [7] en hebben geen of nauwelijks effect in de progressieve fase van MS. Tevens kunnen er ernstige bijwerkingen ontstaan, zoals reactivatie van virussen en autoimmuun-reacties gericht tegen bijvoorbeeld de schildklier, die langdurige behandeling in de weg staan. Daarom zullen ook de komende jaren nieuwe therapieën tegen MS ontwikkeld en getest moeten worden. Voor de progressieve vormen van MS (SP-MS en PP-MS) is er pas één medicijn beschikbaar [8]. Dit komt omdat de pathogene mechanismes die tijdens progressieve MS belangrijk zijn nog onbekend zijn en een goed diermodel nog ontbreekt.

### **Waarom onderzoek in de niet-humane primaat?**

MS is een aandoening die veroorzaakt wordt door complexe interacties tussen het CZS en het gehele afweersysteem. De meeste geneesmiddelen grijpen ook in op deze interacties. Met de huidige stand van proefdier vrije alternatieven is het helaas -nog- niet mogelijk om buiten het levende dier kennis te vergaren over deze interacties of om het effect van geneesmiddelen te bestuderen. Wanneer mogelijk zullen altijd proefdier vrije alternatieven ingezet worden en zullen kandidaat-geneesmiddelen bv. eerst of alleen in knaagdieren getest worden. Er zijn echter situaties waarin niet-humane primaten (NHP) ingezet moeten worden. Het pathologisch proces dat onderzocht wordt of waarop de therapie aangrijpt, kan bv.



in knaagdieren biologisch verschillend zijn van primaten of zelfs compleet afwezig zijn. Ook is het met de huidige technologieën mogelijk om geneesmiddelen steeds specifiek voor de mens te ontwerpen, waardoor ze in knaagdieren hun aangrijpingspunt niet meer herkennen en vaak in apen nog wel.

#### **Diermodellen en adjuvantia**

Er zijn verschillende modellen voor auto-immuun geïnduceerde, neuroinflammatoire aandoeningen (zoals MS) opgezet in twee apensoorten die ingezet worden om fundamentele vragen te adresseren en om kandidaat geneesmiddelen te testen. Grofweg kan gesteld worden dat er een model is dat geschikt is om de chronische inflammatie fase tijdens MS na te bootsen in de marmoset (*Callithrix jacchus*), en een model in de resus makaak (*Macaca mulatta*) dat gepaard gaat met een zich vrij acuut ontwikkelende inflammatie van het brein, en dat daarmee meer lijkt op de acute inflammatie fase tijdens MS.

Cruciaal bij het ontwikkelen van relevante diermodellen voor menselijke auto-immuunziekten is dat de natuurlijke tolerantie van het immuunsysteem voor lichaamseigen producten doorbroken moet worden. Vaak worden om dit te bewerkstelligen hulpstoffen (*adjuvantia*) gebruikt, die het immuunsysteem stimuleren om tegen het gewenste antigeen te reageren. Wanneer in diermodellen auto-immuunziekten opgewekt worden, zijn zeer sterke adjuvantia zoals bijvoorbeeld Compleet Freund's Adjuvant (CFA) noodzakelijk om de tolerantie te doorbreken. In zowel de marmoset als in de resus makaak is het model daarom oorspronkelijk opgezet met CFA als adjuvant. Een belangrijk nadeel van CFA is dat het gebruik ervan gepaard kan gaan met de ontwikkeling van serieuze bijwerkingen, zoals onderhuidse granuloma's. Deze adjuvant-gerelateerde bijwerkingen verhogen het ongerief dat de dieren ondervinden, en zijn mogelijk te voorkomen.

In de marmoset is er de afgelopen twee decennia veel werk verricht om het model te verfijnen door middel van het gebruik van andere antigenen alsmede door te immuniseren in het mildere Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). Dit heeft geleid tot een verfijnd model, dat helaas ook kwetsbaar is gebleken voor minimale veranderingen zoals veranderingen in het dieet [39]. De robuustheid van het model om met voldoende statistische betrouwbaarheid preklinisch onderzoek te doen is hiermee enigszins onder druk komen te staan.

In de resus makaak is het model wel robuust, maar is er nog geen alternatief voor het gebruik van CFA. Pogingen om een adjuvant-vrij model in de resus makaak te ontwikkelen zijn tot nu toe vruchteloos gebleken, en ook het gebruik van andere antigenen heeft nog niet geleid tot een terugdringing van het ongerief. De in de resus makaak optredende bijwerkingen ten gevolge van het gebruik van CFA zijn relatief ernstig in vergelijking met andere diersoorten, en er is er dus een sterke behoefte aan een mild, bijwerkingsarm adjuvant.

Binnen het instituut is de afgelopen jaren gewerkt aan adjuvant ontwikkeling met als doel om adjuvantia te maken die weinig of geen bijwerkingen geven maar die toch een sterk stimulerend effect op het immuunsysteem sorteren. Eén van deze adjuvantia, genaamd MiMyc, is ondertussen uitvoerig getest op de afwezigheid van bijwerkingen en op de aanwezigheid van immuunstimulerende effecten in de resus makaak (zie onder), en is een veelbelovende kandidaat om CFA te vervangen en daarmee het ongerief voor de dieren te verminderen. Dit projectvoorstel vormt daarmee het sluitstuk in een langlopende inspanning om CFA in het EAE model in de resus makaak te vervangen.

#### **Het experimenteel auto-immuun encephalitis (EAE) model in meer detail**

Eén van de best gekarakteriseerde diermodellen voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie is EAE. Het model is ontwikkeld in ratten, muizen en NHP [9, 10]. Het EAE model in de muis heeft in belangrijke mate bijgedragen aan de huidige inzichten in de ziekte mechanismes van MS en er zijn diverse therapieën in ontwikkeld die gebruikt worden voor de behandeling van RR-MS. Een voorbeeld daarvan is het monoclonale antilichaam natalizumab, dat de entree van immuuncellen in het CNS blokkeert. Er is echter ook een lange lijst van aanvankelijk veelbelovende kandidaat geneesmiddelen die de vertaling van de muis naar de mens niet hebben overleefd vanwege onverwachte toxiciteit of afwezigheid van werkzaamheid. Het wordt in toenemende mate duidelijk dat het EAE model in de muis zeker bruikbaar is voor fundamenteel onderzoek aan bepaalde facetten van MS, met name de rol van ontstekingscellen, maar dat het door de afwezigheid van immunologische mechanismes die werkzaam zijn in de chronische fase van MS niet optimaal bruikbaar is voor geneesmiddelontwikkeling. In bepaalde belangrijke opzichten verschilt het EAE model in de muis van MS. De laesies bevinden zich b.v. alleen in



het ruggenmerg, terwijl in MS vooral ook de hersenen zijn aangetast. Tevens lijken deze laesies qua complexiteit niet goed op de laesies in MS patiënten en lijkt oxidatieve stress afwezig te zijn [11]. Ook zijn er verschillen betreffende de immuun mechanismen die tijdens het ziektebeloop belangrijk zijn: in het EAE model in de muis spelen voornamelijk de CD4+ T-helper cellen een rol, terwijl in MS CD8+ killer T cellen zeker ook betrokken zijn.

EAE modellen in NHP lijken in immunologisch en pathologisch opzicht meer op de mens. Het EAE model in de marmoset heeft zich in de afgelopen twintig jaar ontwikkeld tot een zeer bruikbaar preklinisch model voor MS [12, 13, 14-16]. Het diermodel deelt een aantal eigenschappen met progressieve MS, namelijk het chronische ziekteverloop en de ontwikkeling van laesies in zowel de witte als grijze stof, en kan voor beantwoording van onderzoeksvragen of geneesmiddelontwikkeling ingezet worden.

Het EAE model in de resus makaak heeft met de marmoset gemeen dat de pathologie in de hersenen plaats vindt en dat deze in bepaalde aspecten gelijkend aan is aan die in MS. Het EAE model in de resus makaak wordt gebruikt als preklinisch model voor MS, waarbij het vooral bruikbaar is om de acute inflammatie fase te modelleren. Nataluzimab, een medicijn dat goedgekeurd is voor gebruik in RR-MS en de acute inflammatie fase blokkeert, blokkeert dan ook de ontwikkeling van EAE in de resus makaak [22], en nieuwe therapieën voor MS worden ook in dit model getest [23]. In de resus makaak is het ziekteverloop echter acuter en gaat het vergezeld van ernstigere pathologie in de hersenen dan in de marmoset. Naast preklinische studies die zich richten op de acute fase van MS, wordt het diermodel ook gebruikt om fundamentele vragen te beantwoorden die zich richten op de processen die bepalend zijn bij de overgang van acute naar chronische neuroinflammatie.

Zoals al genoemd wordt het EAE model in de resus makaak nog altijd geïnduceerd met behulp van CFA. Voor de inductie wordt het meest regelmatig gebruikt gemaakt van twee antigenen, recombinant humaan myeline oligodendrocyte glycoproteïne (rhMOG) [21], of een peptide daarvan, MOG34-56 [17, 18]. Er is in resus apen nog geen alternatief voor CFA. Immunisatie met rhMOG in IFA leidde b.v. tot EAE in slechts twee van de vijf resus makaken [19], en immunisatie met MOG34-56 in IFA van vijf resus makaken leidde helemaal niet tot klinische effecten (niet gepubliceerd). Deze incidenties zijn te laag voor gebruik in preklinische of fundamentele studies.

Voor preklinische vraagstellingen die betrekking hebben op de chronische inflammatie fase van MS, is de marmoset het model van keuze. Voor preklinische vraagstellingen die betrekking hebben op de acute inflammatie fase van MS, hangt de keuze af van meerdere factoren. Soms is de marmoset b.v. niet geschikt omdat het medicijn niet kruisreageert met het target in marmosets of als er technische beperkingen zijn (b.v. als grote bloed of cerebrospinale vloeistof volumes nodig zijn). Ook kan het zijn dat een kortdurend model gewenst is, omdat de tijd dat een medicijn zijn werk kan doen beperkt is door vorming van neutraliserende antilichamen. Voor studies van fundamentele aard, hangt de keuze van het model af van de specifieke vraagstelling en hebben beide modellen hun eigen voor- en nadelen.

Het gebruik van CFA voor EAE inductie beperkt zich niet tot Nederland, maar ook in labs in China, Japan, Frankrijk, Israël en de Verenigde Staten is dit nog steeds het standaardprotocol [40-48]. De noodzaak tot het gebruik van CFA in het resus model veroorzaakt veel ongerief bij de dieren en wordt zowel binnen als buiten het instituut als zeer ongewenst ervaren. Daarom is er binnen het instituut een *in vitro* onderzoeksprogramma opgezet om nieuwe, mildere adjuvantia te ontwikkelen die minder of geen bijwerkingen hebben maar toch effectief zijn. **Een dergelijk adjuvant is nu ontwikkeld en *in vivo* in resus makaken getest op afwezigheid van bijwerkingen en aanwezigheid van adjuvantiteit (zie hieronder).** Nog onduidelijk is of de adjuverende werking ook sterk genoeg is om tolerantie tegen lichaamseigen antigenen te doorbreken en daarmee een auto-immuunrespons te genereren die uiteindelijk resulteert in orgaan-specifieke pathologie. **Dit voorstel richt zich daarom op het uitvoeren van de proof-of-principle studies om dit mildere adjuvant te testen op functionaliteit in EAE inductie protocollen in de resus makaak.**

**MiMyc in meer detail**



De samenstelling van het *in-huis* ontwikkelde adjuvant MiMyc is volledig gebaseerd op *in vitro* experimenten. De stimulerende werking van adjuvantia op het adaptieve immuunsysteem verloopt voor een groot deel via activatie van receptoren van het aangeboren immuunsysteem. Om de aangeboren immuunrespons die de Mycobacteria die zich in CFA bevinden normaliter induceert in kaart te brengen, hebben wij bioassays ontwikkeld. Deze hebben ons in staat gesteld om zowel in kwalitatief als kwantitatief opzicht de aangeboren immuunrespons die CFA induceert na te bootsen met een mix van specifieke liganden, die wij geformuleerd hebben in IFA en die eventueel uitstekend doseerbaar is.

Vervolgens hebben we een *in vivo* experiment uitgevoerd met als doel om de bijwerkingen van MiMyc in kaart te brengen. De experimentele setup was zo gekozen dat het mogelijk was om ook de effecten van de aan- of afwezigheid van een antigeen te evalueren, evenals het effect van herhaaldelijk immuniseren. De toevoeging van antigeen aan de adjuvant preparaten, heeft ons ook in staat gesteld om geïnduceerde antigeen-specifieke (zowel B-(antilichaam) als T-cel) responsen in het bloed te meten.

Samenvattend geven de gegevens aan dat MiMyc een doseerbaar adjuvant is dat -ook in de hoogst geteste dosis, met toevoeging van antigeen en na herhaaldelijk toedienen- minimale bijwerkingen geeft (niet groter dan immunisatie in IFA). Daarnaast induceert immunisatie met antigeen in MiMyc een sterke specifieke antilichaam respons, en goed meetbare specifieke T cel responsen. Deze responsen zijn duidelijk superieur aan de responsen zoals gevonden na immunisatie met IFA, maar minder robuust dan die gevonden na immunisatie met CFA. Of deze responsen voldoende zijn om tot inductie van EAE te leiden is nog onduidelijk en onderwerp van dit voorstel.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Dit project richt zich op de evaluatie van een mild adjuvant om het model voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie in de resus makaak te induceren. Het doel is om in de resus makaak CFA te vervangen door een adjuvant dat minder of geen bijwerkingen geeft, maar dat wel leidt tot auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie. Dit in het kader van Verfijning.

Nieuwe medicijnen en therapeutische interventies in de processen die een rol spelen bij zowel de acute als de chronische fasen van neuroinflammatie zijn nog steeds hard nodig en zullen de komende jaren op veiligheid en effectiviteit getest dienen te worden in relevante diermodellen, waarbij het dierenwelzijn zo min mogelijk geschaad dient te worden. In een poging dit te bewerkstelligen richten wij ons op de inzet van adjuvantia in de inductiefase van het EAE model, die notoir veel ongerief veroorzaken.

De noodzaak van vervanging van CFA in EAE inductie protocollen in makaken beperkt zich niet ons instituut want ook in labs in China, Japan, Frankrijk, Israël en de Verenigde Staten is dit nog steeds het standaardprotocol [40-48]. De afgelopen vijf jaar worden er gemiddeld eens per jaar resultaten van een grote studie met makaken aan het openbare domein toevertrouwd [45-48]. Studies die plaats hebben gevonden binnen contract research organizations of de farmaceutische industrie worden niet noodzakelijkerwijs allemaal gepubliceerd, en een conservatieve schatting is dat vervanging van CFA voor tussen de 40 en 100 makaken op jaarbasis een aanzienlijke verfijning zou betekenen.

Alhoewel niet het doel van deze studie, zou het gebruik van een milder adjuvant om de ziekte te induceren mogelijkwerwijs een ander EAE ziektebeloop ten gevolge kunnen hebben. Dit zou de bruikbaarheid van het model om wetenschappelijke vragen waarin meer chronische ontstekingsprocessen onderzocht worden, ten goede kunnen komen. Mogelijkerwijs zou MiMyc ook in knaagdiermodellen voor auto-immuunziektes CFA kunnen vervangen. Onderzoek hiernaar zal echter in apart uitgevoerd dienen te worden, gezien er geen enkele garantie is dat resultaten in de resus makaak



zich direct laten vertalen naar knaagdieren. Dit geldt overigens ook omgekeerd. Het eerst testen van MiMyc in andere diersoorten biedt ons geen extra informatie mbt. evt. activiteit in de resus makaak. We weten al dat MiMyc *in vivo* in de resus makaak adjuvant activiteit bezit, en dit zal eerst in knaagdiermodellen bevestigd dienen te worden. Mocht dit niet bevestigd worden, dan is er een discrepantie tussen knaagdieren en resus makaken en zijn verdere testen in het knaagdiermodel uberhaupt niet zinvol. Mocht dit wel bevestigd worden, dan zal een evt. succesvolle EAE inductie in knaagdiermodellen toch gevolgd dienen te worden door een *proof-of-principle* studie in de resus makaak. Onafhankelijk van de uitkomst van proeven in andere diersoorten ziet het traject om te testen of MiMyc ook in resus makaken CFA kan vervangen er dus exact hetzelfde uit.

Het instituut waar dit onderzoek zal worden uitgevoerd heeft in de afgelopen 20 jaar grote expertise opgebouwd op het gebied van EAE modellen in zowel de resus makaak als de marmoset. Het EAE model in de resus makaak is gebruikt voor het testen van natalizumab, een goedgekeurd medicijn voor de behandeling van MS [22], en van een antilichaam tegen CD28 [23]. Verder is in dit model ook gevonden dat auto-immuun responsen die zich richten op oligodendrocyte specific protein, specifieke oog-gerelateerde klinische verschijnselen kunnen veroorzaken die sterk lijken op de verschijnselen bij optische neuritis, een aandoening die vaak optreedt voordat de diagnose MS wordt gesteld [38]. Het EAE model in de marmoset is gebruikt voor het testen van IFN-gamma [24] en antilichamen tegen interleukine (IL)-12p40 [25, 26], cluster of differentiation (CD)40 [27, 28], IL-17A [29], CD20 [30-32], IL-7 receptor (CD127) [33] en tegen de B-cel groeifactoren BLYS en April [34]. Tevens is onderzocht of tolerantie geïnduceerd kan worden met een fusie eiwit dat gebruik maakt van het cholera toxine subunit en een Ig bindende regio van staphylococcus aureus proteïne [35]. Tenslotte is het model gebruikt om de haalbaarheid van stamcel therapie te onderzoeken [36, 37].

Het instituut waar deze studies zullen worden uitgevoerd heeft de beschikking over een grote fokkolonie van resus makaken. Op het instituut is de infrastructuur en de expertise aanwezig om deze studies veilig, op DM-2 en ML-2 niveau, en binnen de gestelde termijn uit te kunnen voeren.

## Referenties

1. Adelman, G. et al. (2013) The cost burden of multiple sclerosis in the United States: a systematic review of the literature. *J Med Econ* 16 (5), 639-47.
2. Compston, A. and Coles, A. (2002) Multiple sclerosis. *Lancet* 359 (9313), 1221-31.
3. Compston, A. and Coles, A. (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372 (9648), 1502-17.
4. Lassmann, H. (2013) Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 333 (1-2), 1-4.
5. Pender, M.P. and Burrows, S.R. (2014) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: potential opportunities for immunotherapy. *Clin Transl Immunology* 3 (10), e27.
6. Vanheusden, M. et al. (2015) Cytomegalovirus: a culprit or protector in multiple sclerosis? *Trends Mol Med* 21 (1), 16-23.
7. Bertolotto, A. and Gilli, F. (2008) Interferon-beta responders and non-responders. A biological approach. *Neurol Sci* 29 Suppl 2, S216-7.
8. Montalban, X. et al. (2017) Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *N Engl J Med* 376 (3), 209-220.
9. Gold, R. et al. (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129 (Pt 8), 1953-71.
10. Friese, M.A. et al. (2006) The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain* 129 (Pt 8), 1940-52.
11. Schuh, C. et al. (2014) Oxidative tissue injury in multiple sclerosis is only partly reflected in experimental disease models. *Acta Neuropathol* 128 (2), 247-66.
12. 't Hart, B.A. et al. (2012) The marmoset monkey: a multi-purpose preclinical and translational model of human biology and disease. *Drug Discov Today* 17 (21-22), 1160-5.
13. Mansfield, K. (2003) Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comp Med* 53 (4), 383-92.



14. Kap, Y.S. et al. (2010) Experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset, a bridge between rodent EAE and multiple sclerosis for immunotherapy development. *J Neuroimmune Pharmacol* 5 (2), 220-230.
15. 't Hart, B.A. et al. (2015) The primate autoimmune encephalomyelitis model; a bridge between mouse and man. *Ann Clin Transl Neurol* 2 (5), 581-93.
16. Kap, Y.S. et al. (2016) The common marmoset as an indispensable animal model for immunotherapy development in multiple sclerosis. *Drug Discov Today* 21 (8), 1200-5.
17. Kerlero de Rosbo, N. et al. (2000) Rhesus monkeys are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein: characterisation of immunodominant T- and B-cell epitopes. *J Neuroimmunol* 110 (1-2), 83-96.
18. Brok, H.P. et al. (2007) The human CMV-UL86 peptide 981-1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide 34-56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys. *J Neuroimmunol* 182 (1-2), 135-52.
19. Haanstra, K.G. et al. (2013) Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis with recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein in incomplete Freund's adjuvant in three non-human primate species. *J Neuroimmune Pharmacol* 8 (5), 1251-64.
20. 't Hart, B.A. et al. (2005) Non-human primate models of experimental autoimmune encephalomyelitis: Variations on a theme. *J Neuroimmunol* 168 (1-2), 1-12.
21. Peschl, P. et al. (2017) Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: Deciphering a Target in Inflammatory Demyelinating Diseases. *Front Immunol* 8, 529.
22. Haanstra, K.G. et al. (2013) Antagonizing the alpha4beta1 Integrin, but not alpha4beta7, inhibits leukocytic infiltration of the central nervous system in rhesus monkey experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 190 (5), 1961-73.
23. Haanstra, K.G. et al. (2015) Selective blockade of CD28-mediated T cell costimulation protects rhesus monkeys against acute fatal experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 194 (4), 1454-66.
24. Jagessar, S.A. et al. (2012) Discrepant effects of human interferon-gamma on clinical and immunological disease parameters in a novel marmoset model for multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 7 (1), 253-65.
25. Brok, H.P. et al. (2002) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets using an anti-IL-12p40 monoclonal antibody. *J Immunol* 169 (11), 6554-63.
26. 't Hart, B.A. et al. (2005) Suppression of ongoing disease in a nonhuman primate model of multiple sclerosis by a human-anti-human IL-12p40 antibody. *J Immunol* 175 (7), 4761-8.
27. Laman, J.D. et al. (2002) Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12). *Eur J Immunol* 32 (8), 2218-28.
28. 't Hart, B.A. et al. (2005) Treatment with chimeric anti-human CD40 antibody suppresses MRI-detectable inflammation and enlargement of pre-existing brain lesions in common marmosets affected by MOG-induced EAE. *J Neuroimmunol* 163 (1-2), 31-9.
29. Kap, Y.S. et al. (2011) Effects of early IL-17A neutralization on disease induction in a primate model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 6 (3), 341-53.
30. Kap, Y.S. et al. (2011) B-cell depletion attenuates white and gray matter pathology in marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 70 (11), 992-1005.
31. Kap, Y.S. et al. (2010) Late B cell depletion with a human anti-human CD20 IgG1kappa monoclonal antibody halts the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in marmosets. *J Immunol* 185 (7), 3990-4003.
32. Jagessar, S.A. et al. (2012) B-cell depletion abrogates T cell-mediated demyelination in an antibody-independent common marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J Neuropathol Exp Neurol* 71 (8), 716-728.
33. Dunham, J. et al. (2016) Blockade of CD127 exerts a dichotomous clinical effect in marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 11 (1), 73-83.
34. Jagessar, S.A. et al. (2012) Antibodies against human BLYS and APRIL attenuate EAE development in marmoset monkeys. *J Neuroimmune Pharmacol* 7 (3), 557-70.
35. Kap, Y.S. et al. (2015) Immune modulation by a tolerogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)10-60 containing fusion protein in the marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis model. *Clin Exp Immunol* 180 (1), 28-39.
36. Pluchino, S. et al. (2009) Human neural stem cells ameliorate autoimmune encephalomyelitis in non-human primates. *Ann Neurol* 66 (3), 343-54.
37. Thiruvalluvan, A. et al. (2016) Survival and functionality of human induced pluripotent stem cell-derived oligodendrocytes in a nonhuman primate model for multiple sclerosis. *Stem Cells Transl Med* 5 (11), 1550-1561.



39. Kap, Y.S. et al. (2018) Targeted Diet Modification Reduces Multiple Sclerosis-like Disease in Adult Marmoset Monkeys from an Outbred Colony. *J. Immunol.* 201(11), 3229-3243.
40. Stimmer L. et al. (2018) Experimental Models of Autoimmune Demyelinating Diseases in Nonhuman Primates. *Vet Pathol.* 55(1):27-41.
41. Jones J.M. et al. (2008) Monkeypox virus viral chemokine inhibitor (MPV vCCI), a potent inhibitor of rhesus macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine.* 43(2):220-8.
42. Teitelbaum D. et al. (2004) Oral glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis: clinical and immunological studies. *Ann N Y Acad Sci.* 1029:239-49.
43. Hu H. et al. (1997) Depletion of T lymphocytes with immunotoxin retards the progress of experimental allergic encephalomyelitis in rhesus monkeys. *Cell Immunol.* 10;177(1):26-34.
44. Rose L.M. et al. (1994) Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in nonhuman primates: a model of multiple sclerosis. *Lab Anim Sci.* 44(5):508-12.
45. Curtis 2<sup>nd</sup> A.D. et al. (2014) The extracellular domain of myelin oligodendrocyte glycoprotein elicits atypical experimental autoimmune encephalomyelitis in rat and Macaque species. *PLoS One.* 10;9(10):e110048. doi: 10.1371/journal.pone.0110048. eCollection 2014. Erratum in: *PLoS One.* 2015;10(2):e0117878.
46. Inaba S.I. et al. (2016) Evaluation of species difference in peripheral lymphocyte reduction effect of CS-0777, a sphingosine 1-phosphate receptor modulator, based on a pharmacokinetic/pharmacodynamic model analysis. *Biopharm Drug Dispos.* 37(9):561-573.
47. Peng Z. et al. (2018) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Model of Cynomolgus Macaques Induced by Recombinant Human MOG1-125 (rhMOG1-125) Protein and MOG34-56 Peptide. *Protein Pept Lett.* 24(12):1166-1178.
48. Fovet C.M. et al. (2019) Intradermal vaccination prevents anti-MOG autoimmune encephalomyelitis in macaques. *EBioMedicine.* 47:492-505.

### 3.3 Belang

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

#### Wetenschappelijk

Een hoog percentage kandidaat geneesmiddelen overleeft de vertaling van diermodel naar MS patiënt niet (>90% voor RR-MS en 100% voor SP- en PP-MS). Een belangrijke oorzaak daarvoor is de kloof tussen de in het preklinisch onderzoek veel gebruikte EAE modellen in knaagdieren en de MS patiënt. De EAE modellen in NHP worden algemeen beschouwd als een relevante overbrugging van deze kloof. De vertaalbaarheid van resultaten verkregen in EAE modellen in knaagdieren wordt negatief beïnvloed door het feit dat alle dieren genetisch zeer nauw verwant zijn (inbred), dat de dieren specific-pathogen free (SPF) gehuisvest zijn (waardoor hun immuunsysteem anders uitrijpt dan wanneer er een normale blootstelling is aan virussen en bacteriën), dat er aanmerkelijke verschillen zijn in de neuropathologie met MS, en dat er een grote genetische afstand is met de mens. EAE modellen in non-SPF, outbred NHP vertonen enerzijds grote immunologische overeenkomsten met MS, anderzijds vertonen ze ook grote neuropathologische overeenkomsten met MS. Onderzoek in NHP modellen kan bv. nieuwe inzichten verschaffen in de overgang van de relapsing-remitting naar de progressieve fase van de ziekte, waarvoor op dit moment nog geen enkele effectieve medicatie bestaat. Optimalisatie van de modellen in NHP is daarbij wel noodzakelijk. Vooral vanuit het oogpunt van dierenwelzijn, waarbij het gebruik van CFA ongerief veroorzaakt dat niet ziekte-gerelateerd is. Daarnaast is het zo, alhoewel dat niet het doel is van dit project, dat een milder adjuvant ook mogelijkheden kan bieden om het acute verloop van het rhesus EAE model te temperen, om daarmee het model ook voor andere toepassingen geschikt te maken.

#### Maatschappelijk

Het maatschappelijk belang van dit project is tweeledig en betreft zowel dier als mens.

Voor de t.b.v. de mens ingezette dieren hebben wij de maatschappelijke verantwoordelijkheid om het ongerief zo klein mogelijk te maken. Vervanging van CFA in het EAE model in de resus makaak door een milder adjuvant met minder of geen bijwerkingen zou het niet-ziekte gerelateerde ongerief voor de



dieren sterk reduceren: een aanzienlijke verfijning. Daarnaast is het zo dat een succesvolle vervanging van CFA in het resus EAE model ook aanleiding zou kunnen geven voor onderzoek naar de mogelijke vervanging van CFA in modellen voor auto-immuunziekten in andere diersoorten, zoals b.v. EAE in marmosets, ratten en muizen en collageen-geïnduceerde artritis in ratten. Het is daarbij nog onduidelijk hoe goed resultaten uit de resus makaak zich laten vertalen naar andere species, en *vice versa*.

Voor de mens is iedere vooruitgang in de behandelingsmogelijkheden van MS een sprong voorwaarts. In Nederland treft de diagnose MS ongeveer 1 op de 1000 mensen. De jaarlijkse kosten voor de zorg en behandeling van deze 17.000 mensen liggen tussen 500 en 700 miljoen euro. De ziekte treft vooral jong-volwassenen en is, na trauma, de belangrijkste oorzaak van neurologische ziekte in jong-volwassenen. MS heeft een enorme impact op de maatschappelijke participatie (werk/sociale contacten) en leidt tot een sterk verminderde kwaliteit van leven. Er is dringend behoefte aan een veilige en effectieve behandeling van MS. De huidige therapieën die ontwikkeld zijn tegen MS werken in een deel van de RR-MS patiënten, maar zijn helaas niet werkzaam in patiënten met SP-MS of PP-MS. Tevens hebben de huidige therapieën veel bijwerkingen zoals terugkerende infecties die langdurig gebruik in de weg staan. Omdat de ziekte een ernstig verloop heeft met blijvende invaliditeit is het zeer belangrijk dat de ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen MS blijft doorgaan.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het uiteindelijke doel van het project is om te testen of MiMyc het gebruik van CFA als adjuvant ter inductie van EAE in resus makaken kan vervangen. Om dit doel te bereiken dient een EAE incidentie van ten minste 80% bereikt te worden, een lagere EAE incidentie leidt tot een sterke toename van de groepsgroottes die nodig zijn voor vergelijkend onderzoek met als gevolg een onbruikbaar diermodel.

Het project is getrapt opgebouwd, en zal bestaan uit één of meerdere EAE studies. De **primaire uitkomst parameter** daarbij is EAE incidentie, en daar worden de studies ook op gepowert (power = 0.8). De hypothese die wij zullen testen is dat de EAE incidentie met MiMyc significant hoger is dan de incidentie verkregen bij immunisatie met IFA; **doel 1**. Leidend bij de experimentele opzet is dat in geen van de experimenten CFA gebruikt zal worden, ook niet als positieve controle, en dat er zo veel mogelijk gebruik gemaakt zal worden van historische controles om het aantal ingezette dieren en het veroorzaakte ongerief tot een minimum te beperken.

Het eerste experiment zal een *pilot* experiment zijn om de potentie van MiMyc om pathogene auto-immuun reacties te helpen induceren te toetsen. Eén groep resus makaken zal geïmmuniseerd worden met MOG peptide 34-56 (pMOG) in één dosis MiMyc. De EAE incidentie in de historische controle groep van dieren geïmmuniseerd met pMOG in IFA is 0%, waardoor een groepsgrootte van 5 dieren volstaat om tot een significant verschil met de historische controlegroep te komen.

De aard van eventueel volgende experimenten is afhankelijk van de uitkomst van dit experiment.

Mocht immunisatie geleid hebben tot klinische EAE, dan zal de EAE incidentie, in combinatie met eventueel optredende bijwerkingen, leidend zijn voor het verdere verloop van het project. Bij een EAE incidentie van 80% of hoger, dan is het onnodig om vervolgentoetsen met rhMOG in de resus makaak uit te voeren, gezien er dan tevens sprake is van een robuust EAE model; **doel 2**. Bij een lagere EAE incidentie hangt het vervolg van de studie af van de gevonden incidentie (zie bijlage).

In elke studie zullen klinische scores, de pathologie in het CZS, immuunresponsen in bloed en lymfoïde organen, alsmede adjuvant-gerelateerde bijwerkingen gemeten worden.

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

De opbouw van het project is gericht op het verkrijgen van een betrouwbaar antwoord op de vraag of immunisatie met auto-antigeen in MiMyc kan leiden tot vervanging van CFA als adjuvant in het resus makaak EAE model. Leidend bij het opstellen van de onderzoeksstrategie zijn 1) het vermijden van CFA (in een eventuele positieve controlegroep), en 2) de inzet van het minimale aantal dieren, geweest.



In een eerste *pilot* experiment met pMOG willen we testen of MiMyc het potentieel bezit om pathogene auto-immuun reacties te helpen induceren. Mocht een EAE incidentie van minimaal 80% bereikt worden, dan is MiMyc daarmee ook geschikt om CFA als adjuvant in EAE modellen in de resus makaak te vervangen. Mocht de EAE incidentie lager dan 80% zijn, dan zullen vervollexperimenten met pMOG of met rhMOG gedaan worden in een poging om tot een robuust (EAE incidentie van minimaal 80%) model te komen.

Om EAE te induceren worden de dieren intracutaan, dorsaal op 10 plekken geïmmuniseerd met autoantigeen in adjuvant. De immunisatie kan evt. gevolgd worden door maximaal 3 maandelijks booster immunisaties tot er neurologische symptomen optreden, waarbij een maximale EAE score van 2 gehanteerd wordt. Scores hierboven, of een tijdsduur langer dan 3 dagen met een score van 2, zullen leiden tot een humaan eindpunt. De dieren zullen dagelijks worden geobserveerd op klinische symptomen behorend tot EAE en op mogelijke ontwikkeling van adjuvant-gerelateerde bijwerkingen. Tijdens de dierproef zal er regelmatig bloed worden afgenomen. Aan het eind van de studie of wanneer het humane eindpunt is bereikt, worden de dieren geëuthanaseerd waarna het CZS wordt onderzocht op pathologie en de immuunresponses in de lymfoïde organen worden geanalyseerd.

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

Het meest frequent gebruikte antigeen voor EAE studies in de resus makaak is MOG. Dit wordt als recombinant humaan eiwit of als peptide geformuleerd in verschillende adjuvantia, met verschillende EAE incidenties tot gevolg (zie Tabel).

Antigeen	EAE Incidentie		Historische controles voor IFA aanwezig?	Benodigde dier# voor significant verschil t.o.v. IFA	Drempel voor EAE inductie
	IFA	CFA			
pMOG	0%	80%	JA	5	HOOG
rhMOG	40%	100%	NEE	10	LAAG

Het vermijden van CFA als positieve controle groep heeft tot gevolg dat onze referentiegroep dus de negatieve controlegroep is (IFA). Wanneer pMOG geformuleerd wordt in IFA dan leidt dat nooit tot EAE. Dit in tegenstelling tot rhMOG formulering in IFA, wat leidt tot een EAE incidentie van 40%. De drempel voor EAE inductie ligt dus lager bij gebruik van rhMOG, wat ook te verwachten is gezien de aanwezigheid van meerdere epitopen die een bijdrage kunnen leveren aan pathogene auto-immuunreacties (in tegenstelling tot het pMOG). Daarnaast is bekend dat de hoeveelheid resterende microbiële verontreiniging in rhMOG van batch-tot-batch kan verschillen, wat ook invloed kan hebben op de EAE incidentie, en wat tevens het meenemen van een historische controlegroep onmogelijk maakt.

Ondanks dat de drempel voor EAE inductie hoger ligt bij gebruik van pMOG en dat de kans op succes dus kleiner is, kiezen wij er toch voor om met dit antigeen te starten in een *pilot* experiment. Gezien de aanwezigheid van een historische negatieve controle groep van 5 dieren, volstaat één groep van 5 dieren om te toetsen of MiMyc pathogene auto-immuunresponsen kan helpen induceren. Mocht dat niet zo zijn, dan is het aantal ingezette dieren en het ongerief initieel tot een minimum beperkt gebleven. Mocht dat wel zo zijn, dan is daarmee bewezen dat MiMyc als kandidaat adjuvant, pathogene auto-immuun responsen kan helpen induceren.

Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 40% of lager zijn, dan is daarmee niet bewezen dat MiMyc significant beter pathogene auto-immuunresponsen kan helpen induceren dan IFA. Wij zullen dan minimaal één vervollexperiment uitvoeren met rhMOG als antigeen, waarbij in dit geval wel een extra controle groep nodig is. Er zullen dan twee groepen van 10 dieren met rhMOG geïmmuniseerd worden, één groep met rhMOG geformuleerd in IFA en één groep met rhMOG in MiMyc. Een EAE incidentie van 60% of lager leidt tot het onsuccesvolle einde van de studie. Wanneer de incidentie 70, 80 of 90% is, dan is de strategie om meer dieren met rhMOG te immuniseren om **doel 2** te behalen (en mogelijk ook **doel 1**). Bij een EAE incidentie van 100% (gelijk aan die van rhMOG in CFA) zijn zowel **doel 1** als **doel 2** bereikt.

Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 60% zijn, dan is daarmee nog niet bewezen dat MiMyc significant beter pathogene auto-immuunresponsen kan helpen induceren dan IFA, gezien de relatief kleine groepsgroottes. Aangezien het resultaat wel veelbelovend is, zullen we dan nog 5 dieren immuniseren met pMOG in MiMyc en 5 dieren met pMOG in IFA om zo mogelijk wel tot een



significant verschil met IFA te kunnen komen (**doel 1**). Doorrekening leert dat -bij groepsgroottes van dan 10 dieren die geïmmuniseerd zijn met pMOG in IFA en MiMyc- het verschil significant is vanaf 60% incidentie. Mochten alle 5 de dieren die met MiMyc geïmmuniseerd zijn EAE ontwikkeld hebben, dan zou de incidentie daarmee op 80% komen en **doel 2** ook bereikt zijn. Mocht de incidentie 60 of 70% zijn, dan is doel 1 daarmee behaald, en dan zou voor het behalen van **doel 2** immunisatie van één groep van 10 dieren met rhMOG in MiMyc volstaan om de EAE incidentie te kunnen inschatten. De verwachting is dat de EAE incidentie hoger zal zijn dan bij immunisatie met pMOG, waarmee de kans op een incidentie van minimaal 80% -**doel 2**- zeer reëel is. We zijn ons volledig bewust van het gegeven dat de spreiding met het lage aantal gebruikte dieren groot is, maar vertrouwen er op dat wanneer er overgegaan wordt op MiMyc als adjuvant de groepsgrootte zal toenemen doordat in toekomstige experimenten met rhMOG voor andere onderzoeksdoelen CFA vervangen kan worden door MiMyc.

Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 80% of hoger zijn, dan zullen er geen vervolg experimenten met rhMOG nodig zijn omdat het model met pMOG dan robuust genoeg is voor gebruik en daarmee zowel **doel 1** als **doel 2** behaald zijn. We zijn ons bewust van het gegeven dat de spreiding met het lage aantal gebruikte dieren groot is, maar vertrouwen er op dat wanneer er overgegaan wordt op MiMyc als adjuvant de groepsgrootte zal toenemen door toekomstige experimenten met pMOG in MiMyc voor andere onderzoeksdoelen. Mocht het opportuun geacht worden, dan zouden wij zelf eventueel ook extra dieren toe kunnen voegen aan ons *pilot* experiment om zo de spreiding terug te brengen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.

10.2.g

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

Volgnummer	Type dierproef
1	Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Non-humane primaten (NHP) worden ingezet in diermodellen voor auto-immuun geïnduceerde, neuroinflammatoire aandoeningen (zoals multipale sclerose (MS)). De verzamelnaam voor de experimentele diermodellen voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie is experimentele auto-immuun encephalitis (EAE). Om EAE te induceren wordt een sterk adjuvant gebruikt, compleet Freund's adjuvant (CFA), dat sterke bijwerkingen tot gevolg heeft, met name in de resus makaak.

Gezien de ernstige aard van de CFA-gerelateerde bijwerkingen in de resus makaak is de behoefte aan vervanging van CFA door een ander, milder adjuvant groot. Daarom is er binnen het Instituut een *in vitro* onderzoeksprogramma opgezet om nieuwe, mildere adjuvantia te ontwikkelen die minder of geen bijwerkingen hebben maar toch effectief zijn. Een dergelijk adjuvant is nu ontwikkeld, genaamd MiMyc, en *in vivo* in resus makaken getest op afwezigheid van bijwerkingen en aanwezigheid van adjuvantiteit. Dit voorstel richt zich op het uitvoeren van de *proof-of-principle* studies om dit mildere adjuvant te testen in een EAE inductie protocol.

Het uiteindelijke doel van het project is om te testen of MiMyc het gebruik van CFA als adjuvant ter inductie van EAE in resus makaken kan vervangen. Om dit doel te bereiken dient een EAE incidentie van ten minste 80% bereikt te worden, een lagere EAE incidentie leidt tot een sterke toename van de groepsgroottes die nodig zijn voor vergelijkend onderzoek en therapie evaluaties met als gevolg een onbruikbaar diermodel.



Het project is getrapt opgebouwd, en zal bestaan uit één of meerdere EAE studies. De **primaire uitkomstparameter** daarbij is EAE incidentie, en daar zijn de studies ook op gepowered (power = 0.8). **Secundaire uitkomstparameters** zijn optredende perifere T en B cel responsen. Tevens wordt de tijd tot het humane eindpunt gescoord (zie EAE score tabellen in paragraaf J). De dieren worden aan het eind van de studie, of wanneer het humane eindpunt bereikt is, geëuthanaseerd. Post mortem wordt dan de ernst van de pathologie in de hersenen en het ruggenmerg geanalyseerd, en in het bloed en de lymfoïde organen wordt de activatie van het immuunsysteem verder onderzocht.

*De hypothese die wij zullen testen is dat de EAE incidentie met MiMyc significant hoger is dan de incidentie verkregen bij immunisatie met incompleet Freund's adjuvant (IFA) – **doel 1**. Leidend bij de experimentele opzet is dat in geen van de experimenten CFA gebruikt zal worden, ook niet als positieve controle, en dat er zo veel mogelijk gebruik gemaakt zal worden van historische controles om het aantal ingezette dieren en het veroorzaakte ongerief tot een minimum te beperken. Het uiteindelijke doel dat wij nastreven is om m.b.v. MiMyc een robuust, bijwerkingsvrij of bijwerkingsarm, EAE inductie protocol (incidentie van minimaal 80%) op te zetten en daarmee CFA overbodig te maken – **doel 2**.*

Het meest frequent gebruikte antigeen voor EAE studies in de resus makaak is myeline oligodendrocyte glycoproteïne (MOG). Dit wordt als recombinant humaan eiwit (rhMOG) of als peptide (pMOG) geformuleerd in verschillende adjuvantia, met verschillende EAE incidenties tot gevolg (zie Tabel 1). In de voorgestelde studie is MOG ook het autoantigeen van keuze.

Antigeen	EAE incidentie		Historische controles voor IFA aanwezig?	Benodigde dier# voor significant verschil t.o.v. IFA	Drempel voor EAE inductie
	IFA	CFA			
pMOG	0%	80%	JA	5	HOOG
rhMOG	40%	100%	NEE	10	LAAG

**Tabel 1.** Historische gegevens over EAE incidenties verkregen met verschillende adjuvantia en verschillende antigenen.

#### Referenties:

1. Haanstra, K.G. et al. (2013) Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis with recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein in incomplete Freund's adjuvant in three non-human primate species. *J Neuroimmune Pharmacol* 8 (5), 1251-64.
2. Dunham, J. et al. (2017) Severe oxidative stress in an acute inflammatory demyelinating model in the rhesus monkey. *PLoS One* 12 (11), e0188013.
3. Haanstra, K.G. et al. (2013) Antagonizing the alpha4beta1 integrin, but not alpha4beta7, inhibits leukocytic infiltration of the central nervous system in rhesus monkey experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 190 (5), 1961-73.
4. Haanstra, K.G. et al. (2015) Selective blockade of CD28-mediated T cell costimulation protects rhesus monkeys against acute fatal experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 194 (4), 1454-66.
5. Kerlero de Rosbo, N. et al. (2000) Rhesus monkeys are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein: characterisation of immunodominant T- and B-cell epitopes. *J Neuroimmunol* 110 (1-2), 83-96.
6. Brok, H.P. et al. (2007) The human CMV-UL86 peptide 981-1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide 34-56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys. *J Neuroimmunol* 182 (1-2), 135-52.
7. Haanstra, K.G. et al. (2013) Induction of encephalitis in rhesus monkeys infused with lymphocryptovirus-infected B-cells presenting MOG34-56 peptide. *PLoS ONE* 8 (8), e71549

10.2.e

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

- Voordat de dieren geïmmuniseerd worden zal er bloed worden afgenomen voor de bepaling van individuele nul waarden van relevante parameters en indien nodig voor het maken van getransformeerde B-cellen (deze kunnen later dienen als antigeen presenterende cellen in eventuele cellulaire *in vitro* assays). Na immunisatie zal wekelijks bloed worden afgenomen voor het bepalen van relevante immuun



parameters (B en T cel responsen). Veranderingen in deze parameters zijn belangrijk om de effectiviteit van MiMyc als adjuvant te kunnen inschatten alsmede om de effecten van booster injecties te bestuderen; wekelijkse meetpunten geven een afdoende resolutie daarvoor. De maximaal toelaatbare bloed volumes worden hierbij in acht genomen.

- De huidige methode om EAE te induceren maakt gebruik van intracutane injecties op de rug met een emulsie, bevattende recombinant humaan myeline oligodendrocyte glycoproteïne (rhMOG) of een MOG peptide (34-56, pMOG) in adjuvant. Indien nodig, wordt deze handeling maandelijks herhaald (met een maximum van vier immunisaties totaal), totdat een dier EAE score 2 heeft ontwikkeld of het einde van de studie is bereikt (maximaal ongeveer 120 dagen).
- Voor wekelijkse bloedafname en gelijktijdige lichaamsgewicht meting worden de dieren gesedeerd, tevens worden dan de inoculatie plaatsen op adjuvant-gerelateerde bijwerkingen gescoord en m.b.v. niet-invasieve infrarood technologie geanalyseerd op onderhuidse ontstekingsactiviteit.
- De klinische score behorend bij EAE wordt dagelijks gemonitord. Daarbij wordt een standaard score systeem gehanteerd waarmee de gradatie van neurologische defecten wordt vastgelegd.

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

Op basis van historische studies is een positieve controle groep (waarbij CFA als adjuvant gebruikt wordt) niet noodzakelijk, en die is dus ook afwezig. Dit brengt het aantal benodigde dieren terug, en beperkt tevens het bijwerkings geassocieerde ongerief. **Om de groepsgroottes te bepalen is de te toetsen werkhypothese (doel 1) dat immunisatie in MiMyc een statistisch significant hogere EAE incidentie tot gevolg heeft ten opzichte van een beperktere incidentie in de groep waarbij IFA als adjuvant gebruikt werd.** Afhankelijk van het gebruikte antigeen (rhMOG of pMOG) leidt dit tot een andere proefopzet en andere groepsgroottes gezien er verschillende EAE incidenties in de IFA controlegroep zijn. Leidend bij iedere proefopzet is de minimale groepsgrootte om tot een significant verschil (en dus een antwoord op de gestelde onderzoeksvraag) te komen, uitgerekend m.b.v. power analyses (=0.8) uitgevoerd op een van te voren ingeschat verschil.

Het vermijden van CFA als positieve controle groep heeft tot gevolg dat onze referentiegroep dus de negatieve controlegroep is (IFA). Wanneer pMOG geformuleerd wordt in IFA dan leidt dat nooit tot EAE. Dit in tegenstelling tot rhMOG formulering in IFA, wat leidt tot een EAE incidentie van 40%. De drempel voor EAE inductie ligt dus lager bij gebruik van rhMOG, wat ook te verwachten is gezien de aanwezigheid van meerdere epitopen die een bijdrage kunnen leveren aan pathogene auto-immunreacties (in tegenstelling tot het pMOG). Daarnaast is bekend is dat de hoeveelheid resterende microbiële verontreiniging in rhMOG van batch-tot-batch kan verschillen, wat ook invloed kan hebben op de EAE incidentie, en wat tevens het meenemen van een historische controlegroep onmogelijk maakt.

Ondanks dat de drempel voor EAE inductie hoger ligt bij gebruik van pMOG en dat de kans op succes dus kleiner is, kiezen wij er toch voor om met dit antigeen te starten in een *pilot* experiment. Gezien de aanwezigheid van een historische negatieve controle groep van 5 dieren, volstaat één groep van 5 dieren om te testen of MiMyc beter pathogene auto-immunresponsen kan helpen induceren dan IFA (zie Tabel 2). Mocht dat niet zo zijn, dan is het aantal ingezette dieren en het ongerief initieel tot een minimum beperkt gebleven. Mochten we wel EAE kunnen induceren m.b.v. MiMyc, dan hangen de vervollexperimenten af van de incidentie.

Adjuvant	Groepsgrootte	#dieren met EAE	Incidentie (95% CI)	Significant tov IFA
IFA	5	0	0% (0 - 43%)	Nvt
MiMyc	5	0	0% (0 - 43%)	Nee
	5	1	20% (4 - 62%)	Nee
	5	2	40% (12 - 77%)	Nee
	5	3	60% (23 - 88%)	Nee
	5	4	80% (38 - 96%)	Ja
	5	5	100% (57 - 100%)	Ja

**Tabel 2.** Doorgerekende uitkomsten en statistische consequenties van immunisatie van pMOG in IFA (historische gegevens) en MiMyc (hypothetische uitkomsten). Fisher's exact test: power = 0.8.



Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 40% of lager zijn, dan is daarmee niet bewezen dat MiMyc significant beter pathogene auto-immuunresponsen kan helpen induceren dan IFA. Wij zullen dan minimaal één vervolggroep uitvoeren met rhMOG als antigeen, waarbij in dit geval wel een extra controle groep nodig is. Er zullen dan twee groepen van 10 dieren met rhMOG geïmmuniseerd worden, één groep met rhMOG geformuleerd in IFA en één groep met rhMOG in MiMyc (zie Tabel 3). Uit deze tabel blijkt dat wij alleen bij een 100% EAE incidentie met rhMOG in MiMyc (gelijk aan die van rhMOG in CFA), een significant verschil bereiken t.o.v de ingeschatte 40% incidentie met rhMOG in IFA. Hierbij geldt wel de kanttekening dat er batch-batch verschillen zijn tussen de preparaten rhMOG (zoals al eerder aangegeven) die de daadwerkelijke EAE incidentie in IFA kunnen beïnvloeden, zowel naar boven als beneden, en daarmee ook de criteria voor het bereiken van significante verschillen. Mocht immunisatie met rhMOG in MiMyc niet resulteren in een EAE incidentie van 100%, dan is het experiment daarmee zeker niet mislukt. Wanneer de incidentie 70, 80 of 90% is, dan is de strategie om meer dieren met rhMOG te immuniseren om **doel 2** te behalen (en mogelijk ook door de toename van de groepsgrootte ook **doel 1**). Bij EAE incidenties van 60% of lager is MiMyc niet geschikt om CFA te vervangen.

Adjuvant	Groepsgrootte	#dieren met EAE	Incidentie (95% CI)	Significant t.o.v. IFA
IFA	10	4	40% (17 - 69%)	Nvt
MiMyc	10	4	40% (17 - 69%)	Nee
	10	5	50% (24 - 76%)	Nee
	10	6	60% (31 - 83%)	Nee
	10	7	70% (40 - 89%)	Nee
	10	8	80% (49 - 94%)	Nee
	10	9	90% (60 - 98%)	Nee
	10	10	100% (72 - 100%)	Ja

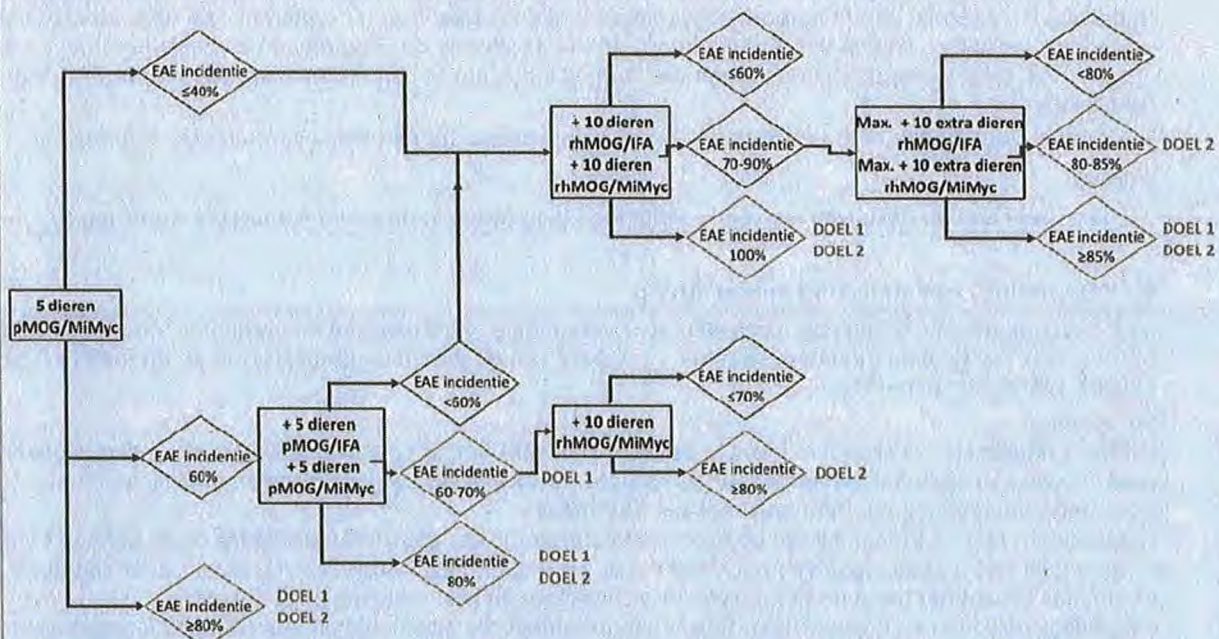
**Tabel 3.** Doorgerekende uitkomsten en statistische consequenties van immunisatie van rhMOG in IFA (voorspelde gegevens op basis van eerdere experimenten) en MiMyc (hypothetische uitkomsten). Fisher's exact test, power = 0.8.

Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 60% zijn, dan is daarmee nog niet bewezen dat MiMyc significant beter pathogene auto-immuunresponsen kan helpen induceren dan IFA, gezien de relatief kleine groepsgroottes. Aangezien het resultaat wel veelbelovend is, zullen we dan nog 5 dieren immuniseren met pMOG in MiMyc en 5 dieren met pMOG in IFA om zo mogelijk wel tot een significant verschil te kunnen komen (**doel 1**). Doorrekening leert dat -bij groepsgroottes van dan 10 dieren die geïmmuniseerd zijn met pMOG in IFA en MiMyc- het verschil significant is vanaf 60% incidentie. Mochten alle 5 de dieren die met MiMyc geïmmuniseerd zijn EAE ontwikkeld hebben, dan zou de incidentie daarmee op 80% komen en **doel 2** ook bereikt zijn. Mocht de incidentie 60 of 70% zijn, dan is **doel 1** daarmee behaald, en dan zou voor het behalen van **doel 2** immunisatie van één groep van 10 dieren met rhMOG in MiMyc volstaan om de EAE incidentie te kunnen inschatten (zie Tabel 3). De verwachting is dat de EAE incidentie hoger zal zijn dan bij immunisatie met pMOG, waarmee de kans op een incidentie van minimaal 80% -**doel 2**- zeer reëel is. We zijn ons volledig bewust van het gegeven dat de spreiding met het lage aantal gebruikte dieren groot is (zie Tabel 3 voor spreidingen), maar vertrouwen er op dat wanneer er overgegaan wordt op MiMyc als adjuvant de groepsgrootte zal toenemen doordat in toekomstige experimenten met rhMOG voor andere onderzoeksdoelen CFA vervangen kan worden door MiMyc.

Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 80% of hoger zijn, dan zullen er geen vervolggroepen met rhMOG nodig zijn omdat het model met pMOG dan robuust genoeg is voor gebruik en daarmee zowel **doel 1** als **doel 2** behaald zijn. We zijn ons bewust van het gegeven dat de spreiding met het lage aantal gebruikte dieren groot is (zie Tabel 2: in geval van 80%, 38 - 96% en in geval van 100%, 57 - 100%), waar in eerste instantie ook rekening mee gehouden moet worden wanneer nieuwe studies voor bv therapie evaluatie gedaan zouden worden met MiMyc ipv CFA. Maar net zoals het geval is voor rhMOG, zullen deze toekomstige studies ook leiden tot een toename van de groepsgroottes en daarmee tot een afname van de spreiding.

Een flowchart met go/no-go beslis momenten is weergegeven in Figuur 1.





**Figuur 1.** Studie ontwerp en go/no-go beslispunten.

## B. De dieren

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

**Resus makaak (*Macaca mulatta*), n=55 volwassen, M/V.**

**Diersoort:** Resus makaken (*Macaca mulatta*) zijn niet-menselijke primaten die zeer geschikt zijn voor translationeel onderzoek naar acuut verloopende ontstekingsreacties van het brein zoals de acute fasen van MS; er kunnen nieuwe therapieën in worden getest maar ze kunnen ook worden gebruikt om het ziekteverloop, de pathologie of de rol van virussen hierin (met name van virussen die slechts primaten infecteren) te onderzoeken.

**Herkomst:** De dieren zullen afkomstig zijn van de eigen fok binnen het instituut waar het experiment wordt uitgevoerd of in uitzonderingsgevallen van een erkende leverancier, waarbij de richtlijnen van de EU zullen worden gevolgd.

**Levensstadia:** De dieren moeten volwassen zijn, zodat ze een goed ontwikkeld immuunsysteem en centraal zenuwstelsel hebben.

**Aantal:** De verwachting is dat er maximaal 4 studies worden gedaan op deze bijlage. Het eerste experiment bestaat uit één groep van 5 dieren. Verdere mogelijke experimenten zullen bestaan uit 1 of 2 groepen, van naar verwachting maximaal 10 dieren per groep. Wij verwachten maximaal 55 resus makaken nodig te hebben.

**Geslacht:** Er is geen verschil aangetoond tussen de sexen in het EAE model. Afhankelijk van de vraagstelling en beschikbaarheid zal er worden gekozen voor een of beide geslachten.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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



Gezien de lange levensduur van resus makaken is het mogelijk dat dieren die zullen worden gebruikt in de dierproeven, gebruikt zijn in eerdere dierproeven. Indien sprake is van hergebruik, zal deze plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1<sup>e</sup> van de Wet op de Dierproeven en zoals beschreven in de Toelichting. Geselecteerde dieren mogen niet behandeld zijn met een product dat kan interfereren met het EAE model.

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

Nee

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

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

##### **Vervanging:**

MiMyc is uitgebreid *in vitro* en *in vivo* (in de resus makaak) getest op zowel bijwerkingen als op adjuvant werking. De voorgestelde experimenten zijn *proof-of-principle* studies om te testen of MiMyc CFA als adjuvant kan vervangen in het resus makaak EAE model.

Helaas is het nog niet mogelijk om op een proefdier vrije manier auto-immuunziektes na te kunnen bootsen. In het geval van ontstekingen van het brein (zoals bij EAE en MS) wordt dit veroorzaakt door complexe interacties tussen het brein en het gehele afweersysteem en zeer waarschijnlijk ook door omgevingsinvloeden en levensstijlen. Bestaande proefdier vrije alternatieven kunnen deze interacties –nog– niet nabootsen.

Ook testen in andere diersoorten bieden hier geen uitkomst of extra informatie. Wanneer we zouden besluiten om MiMyc eerst in knaagdiermodellen voor EAE te testen, dan zou –onafhankelijk van de uitkomst van deze proeven– het traject om te testen of MiMyc ook in resus makaken CFA kan vervangen er exact hetzelfde uit zien. *De facto* zou dit dus alleen maar extra dieren kosten.

##### **Vermindering:**

Het minimaal benodigd aantal dieren zal worden ingezet om tot statistisch relevante informatie te komen. Daartoe zijn vantevoren powercalculaties uitgevoerd (zie boven). De complete onderzoeksstrategie is getrapd opgebouwd, waarbij begonnen wordt met een *proof-of-principle* studie die een minimaal aantal dieren vereist. De onderzoeksstrategie is zo gekozen dat positieve controlegroepen niet nodig zijn en dat voor de negatieve controlegroepen zoveel mogelijk gebruik gemaakt wordt van historische controles.

##### **Verfijning:**

Eén van de belangrijkste doelen van dit voorstel is verfijning. Door het veranderen van het EAE inductie-protocol, verwachten we dat makaken minder granuloma's ontwikkelen op de immunisatie plekken.

Alle dieren worden getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.

Tijdens de experimenten wordt onnodig ongerief vermeden door het gebruik van sedatie/pijnstilling. We werken met een cumulatieve discomfort schaal (zie paragraaf J) en dieren zullen worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.

Als een dier door omstandigheden (zoals het bereiken van humaan eindpunt van een kooigenoot) gedurende de studie individueel komt te zitten, wordt er geen nieuwe partner geïntroduceerd omdat dit meer stress oplevert dan individuele huisvesting voor de resterende tijd van een studie.

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

**Training:** De dieren worden voor aanvang van de studie getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken, waardoor de stress kan worden verminderd.

**Welzijn:** Tijdens de studie zullen de dieren dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente dierverzorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag, eetlust of ontlasting, dan zal de surveillance frequentie verhoogd worden en wordt de veterinaire hiervan op de hoogte gesteld waarmee



indien nodig een behandelplan zal worden opgesteld (zoals bv. aanbieden van andere voeding). Mocht het dier neurologische verschijnselen ontwikkelen of een afname van het gezichtsvermogen dan zal de observatie geïntensiveerd worden; mocht daar aanleiding toe zijn, dan zal het betreffende dier uit studie genomen worden.

Medicatie: Pijn en lijden kunnen worden waargenomen. In een dergelijk geval zal in overleg met de dierenartsen worden besloten of er adequate pijnbestrijding kan en moet worden voorgeschreven. De medicatie die kan worden toegediend is afhankelijk van het experiment. In de meeste gevallen mag de pijnmedicatie geen anti-ontstekingsmiddelen bevatten omdat deze mogelijk interfereren met de vraagstelling.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Niet van toepassing

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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



In MS patiënten wordt soms pijnlijke spasticiteit waargenomen. Dit is tot nu toe niet gezien in EAE studies, maar kan niet voor de volle 100% worden uitgesloten. Wanneer symptomen van pijn worden geobserveerd zal orale of parenterale pijnstilling worden toegediend na overleg met de veterinar. De medicatie die kan worden toegediend is afhankelijk van het experiment. In de meeste gevallen mag de pijnmedicatie geen ontstekingsremmende middelen bevatten

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. ongerief door toediening van een injectie/bijwerking adjuvant
2. ongerief door sedatie en ontwaken uit sedatie
3. ongerief door klinische symptomen EAE
4. evt. single huisvesting

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. De inspuiting van een kleine hoeveelheid inoculum voor immunisatie kan ontsteking en irritatie geven. Wij verwachten -gezien het uitgebreide voorwerk dat is verricht met Mimyc- dat er zich geen granuloma's zullen vormen. Wij kunnen dit echter niet helemaal uitsluiten. Immunisatie met MiMyc is getest in combinatie met virale antigenen, en nog nooit met auto-antigenen zoals MOG.
2. Bijkomen uit een sedatie kan een gevoel van desoriëntatie en/of misselijkheid met zich meebrengen.
3. EAE leidt tot symptomen als ataxie, blindheid, paresis en paralyse. Het verlies van neurologische functies kan als stressvol worden ervaren.
4. Dieren worden normaliter in duo's gehuisvest omdat het sociale dieren zijn. Alleen gehuisvest zitten kan stress geven. Wanneer een kooimaatje vanwege de ernst van de EAE uit de studie dient te worden genomen, is single huisvesting echter onontkoombaar.

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

1. Alle dieren worden getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.
2. Voor sedatie moet het dier nuchter blijven. Daarnaast worden alle dieren extra in de gaten gehouden na het ontwaken en wanneer nodig zal de veterinar worden geraadpleegd.
3. We werken met een cumulatieve discomfort schaal (zie paragraaf J). Dieren worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.
4. Als een dier door omstandigheden (zoals het bereiken van het humane eindpunt van een kooigenoot) gedurende de studie individueel komt te zitten, wordt er geen nieuwe partner geïntroduceerd omdat dit meer stress oplevert dan individuele huisvesting voor de resterende tijd van een studie.

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dieren worden geëuthanaseerd, gevolgd door uitgebreide sectie, wanneer het eindpunt volgens de tabellen is bereikt, of als het maximaal aantal vooraf geplande dagen is bereikt, of wanneer het algemeen welzijn door andere omstandigheden ernstig wordt aangetast. De maximale duratie in de tabellen is cumulatief. De humane eindpunten voorkomen dat matig ongerief ernstig wordt en daarom is er geen sprake van ernstig ongerief in deze dierproef. Door hanteren van deze eindpunten worden de dieren uit studie genomen in een fase waarin de dieren nog steeds zelfredzaam zijn en waarin zelfstandig eten en drinken en het aangaan van sociale interacties in voldoende mate mogelijk blijven.



EAE score	Klinische symptomen	Maximale cumulatieve tijdsduur
0	Asymptomatisch	Einde experiment
0.5	Verminderd alert, veranderd loopgedrag zonder ataxie, Verminderde eetlust, braken	Einde experiment
1	Apathisch (verminderde reactie op externe prikkel)	Einde experiment
2	Ataxie (= evenwichtsstoornis), afname gezichtsvermogen	Maximaal 3 dagen
2.5	Parese (incomplete verlamming) van 1 of meer ledematen	24 uur
3.0	Paralyse (complete verlamming) van 1 (hemiplegie) of meerdere ledematen (paraplegie)	24 uur
4.0	Complete verlamming van 4 ledematen (quadriplegie)	<12 uur
5.0	Lethargie (geen reactie op externe prikkel) Niet zelfstandig kunnen eten en drinken, Meer dan 2 dagen blind, Onbehandelbare pijn	<2 uur

**Tabel 4: Cumulatieve EAE scoringstabel voor resus makaken**

Dieren worden dagelijks gemonitord voor symptomen. Vanaf score 1 wordt dit meerdere keren per dag gedaan. Wanneer een score bereikt wordt hoger dan score 2, dan zal euthanasie zo snel mogelijk plaats vinden, het is daarmee onwaarschijnlijk -maar niet volledig uit te sluiten- dat scores boven de 2.5 uit zouden komen.

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

Tussen de 80 en 100%.

#### K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief wordt geclassificeerd als 'matig'. Het ongerief wordt bepaald door herhaalde bloedafnames, herhaalde injecties en het ontwikkelen van EAE symptomen, waarbij een maximale EAE score van 2 gehanteerd wordt. Scores hierboven (zoals die mogelijkwerwijs alleen maar op zouden kunnen treden door een onverwachts snelle ziekteprogressie en die daarmee direct tot euthanasie zouden leiden), of een tijdsduur langer dan 3 dagen met een score van 2, zullen leiden tot een humaan eindpunt. De kans op ontwikkeling van verlamingsverschijnselen is hiermee zeer klein. Indien er geen EAE symptomen optreden, bijvoorbeeld omdat de nieuwe inductie-methode niet het gewenste resultaat oplevert, blijft het ongerief matig als gevolg van de herhaalde bloedafnames en injecties.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

De dieren worden altijd gedood aan het einde van het experiment. Ten einde onderzoek te kunnen doen naar de pathologie in het CZS en de immuunresponsen in de lymfoïde organen is het noodzakelijk de dieren te euthanaseren. Ook wanneer de dieren geen neurologische verschijnselen ontwikkeld hebben, is het mogelijk dat er subklinisch wel neuroinflammatie aantoonbaar is. Deze informatie is erg belangrijk en alleen te verkrijgen na necropsie en neuropathologische analyse.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



**Van:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**Aan:** [Kasbeheer](#)  
**Onderwerp:** Betaalgegevens AVC 10.2.g  
**Datum:** dinsdag 3 maart 2020 11:40:38

---

Er is een nieuwe aanvraag ontvangen. Hiervoor is een factuur verstuurd. Hieronder de gegevens t.b.v. het opboeken van de factuur.

NAW-gegevens:

10.2.g  
[Redacted]

Factuurdatum: 03-03-2020  
Factuurnummer: 10.2.g  
Aanvraagnummer: AVD 10.2.g  
Factuurbedrag: EUR 1.389,00

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



**Van:** [Info-zbo](mailto:Info-zbo)  
**Aan:** 10.2.e  
**Onderwerp:** FW: AVD10.2.g  
**Datum:** dinsdag 3 maart 2020 11:50:01  
**Bijlagen:** [OntvangstBevestiging.pdf.html](#)

---

Geachte heer 10.2.e

In de bijlage treft u de ontvangstbevestiging van uw **aanvraag AVD10.2.g** aan, waarnaar wij gemakshalve naar verwijzen.

Met vriendelijke groet,

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

**Nationaal Comité advies dierproevenbeleid** [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

.....  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
**T: 0900 2800028**  
**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)**



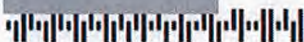


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g

10.2.e

10.2.g



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVC 10.2.g

**Bijlagen**

2

Datum 3 maart 2020

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 3 maart 2020. Het gaat om uw project "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD10.2.g. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.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:**

3 maart 2020

**Aanvraagnummer:**

AVC10.2.g





**Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:

10.2.g

Naam instelling of organisatie:

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

Dhr. 10.2.e

Straat en huisnummer:

10.2.g

Postbus:

Postcode en plaats:

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

10.2.e

Functie:

Unithoofd

Afdeling:

Alternatives

Telefoonnummer:

10.2.e

E-mailadres:

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam:

10.2.e

Functie:

Afdelingshoofd

Afdeling:

Animal Science

Telefoonnummer:

10.2.e

E-mailadres:

**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 april 2020  
Geplande einddatum: 1 april 2025  
Titel project: Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap  
diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie  
Titel niet-technische  
samenvatting: Testen van een nieuw adjuvans, met minder of geen  
bijwerkingen , om een autoimmuunziektes van het brein te  
modelleren in de resus makaak  
Naam DEC: DEC-10.2.g  
Postadres DEC: Postbus 10.2.g  
E-mailadres DEC: dec@10.2.g

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.389,-  
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: Adjunct Directeur  
Plaats: 10.2.g  
Datum: 2 maart 2020



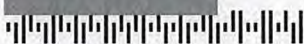


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g

10.2.e

10.2.g



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD10.2.g

**Bijlagen**

2

Datum 3 maart 2020

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 3 maart 2020

Vervaldatum: 2 april 2020

Factuurnummer: 209464

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10.2.g	€ 1.389,00

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.



**Van:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**Aan:** 10.2.e  
**Cc:**  
**Onderwerp:** Verzoek om advies AVD 10.2.g verstuurd aan DEC  
**Datum:** dinsdag 3 maart 2020 11:46:12

---

Geachte meneer, mevrouw,

Op 03-03-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" met aanvraagnummer AVD 10.2.g .

Uw aanvraag is naar DEC 10.2.g gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



**Van:** Info-zbo  
**Aan:** "dec@ 10.2.g"  
**Onderwerp:** FW: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD 10.2.g  
**Datum:** dinsdag 3 maart 2020 11:52:16  
**Bijlagen:** [Projectvoorstel.pdf.html](#)  
[Aanvraag.pdf.html](#)  
[Beschrijv. DP .pdf.html](#)  
[NTS.pdf.html](#)

---

Geachte leden van DEC 10.2.g

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" en aanvraagnummer: AVD 10.2.g

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 03-03-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermin vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 03-03-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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



T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



**Van:** [Info-zbo@dec@10.2.g](mailto:Info-zbo@dec@10.2.g)  
**Aan:** [Info-zbo@dec@10.2.g](mailto:Info-zbo@dec@10.2.g)  
**Onderwerp:** Aanvraag 10.2.g  
**Datum:** dinsdag 3 maart 2020 11:58:05  
**Bijlagen:** [Aanvraag.pdf](#)

---

Geachte leden van DEC [10.2.g](#)

De stukken in 1 keer versturen lukt niet, de mail wordt geweigerd door jullie server, hierbij stuur ik ze handmatig naar jullie toe. Excuus voor het ongemak.

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" en aanvraagnummer: AVD [10.2.g](#).

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 03-03-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 03-03-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



Van: [Info-zbo](mailto:Info-zbo)  
Aan: "dec@10.2.g"  
Onderwerp: 10.2.g  
Datum: dinsdag 3 maart 2020 12:00:48  
Bijlagen: [Beschrijv. DP .pdf](#)

---

Geachte leden van DEC 10.2.g

De stukken in 1 keer versturen lukt niet, de mail wordt geweigerd door jullie server, hierbij stuur ik ze handmatig naar jullie toe. Excuus voor het ongemak.

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diemodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" en aanvraagnummer: AVD10.2.g

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 03-03-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 03-03-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



**Van:** Info-zbo  
**Aan:** "dec@10.2.g"  
**Onderwerp:** 10.2.g  
**Datum:** dinsdag 3 maart 2020 12:01:33  
**Bijlagen:** NTS.pdf

---

Geachte leden van DEC 10.2.g

De stukken in 1 keer versturen lukt niet, de mail wordt geweigerd door jullie server, hierbij stuur ik ze handmatig naar jullie toe. Excuus voor het ongemak.

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diemodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" en aanvraagnummer: AVD 10.2.g .

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 03-03-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 03-03-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



**Van:** [Info-zbo](mailto:Info-zbo)  
**Aan:** "dec@10.2.g"  
**Onderwerp:** Projectvoorstel  
**Datum:** dinsdag 3 maart 2020 12:02:41  
**Bijlagen:** [Projectvoorstel.pdf](#)

---

Geachte leden van DEC [10.2.g](#)

De stukken in 1 keer versturen lukt niet, de mail wordt geweigerd door jullie server, hierbij stuur ik ze handmatig naar jullie toe. Excuus voor het ongemak.

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diemodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" en aanvraagnummer: AVD [10.2.g](#).

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 03-03-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 03-03-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 280028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



Van: 10.2.e  
 Aan: Info-zbo; dec@10.2.g  
 Onderwerp: Re: Projectvoor  
 Datum: dinsdag 3 maart 2020 15:28:12

Geachte leden van de CCD,

Hierbij bevestig ik de ontvangst van de projectvergunningsaanvraag AVD<sup>10.2.g</sup>. Wij zullen de aanvraag in behandeling nemen en bespreken in de vergadering van 12 maart 2020.

Vriendelijke groeten,

10.2.e  
 10.2.e DEC-10.2.g

Op 03-03-20 12:03 heeft Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)> geschreven:

Geachte leden van DEC<sup>10.2.g</sup>

13

De stukken in 1 keer versturen lukt niet, de mail wordt geweigerd door jullie server, hierbij stuur ik ze handmatig naar jullie toe. Excuus voor het ongemak.

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" en aanvraagnummer: AVD<sup>10.2.g</sup>.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 03-03-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermin vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 03-03-2020 bij de CCD in te dienen,



dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

10.2.g





9464



05 MRT 2020

### 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](http://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 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	10.2.g
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats IBAN Tenaamstelling van het rekeningnummer	10.2.g 10.2.e 10.2.g
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>		
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	10.2.e Unithoofd Alternatives 10.2.e
			<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. Mw.
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	
			<input type="checkbox"/> Dhr. Mw.



- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |                |                                     |
|-----------------------------|----------------|-------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters | 10.2.e         | X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | Afdelingshoofd |                                     |
| Afdeling                    | Animal Science |                                     |
| Telefoonnummer              | 10.2.e         |                                     |
| E-mailadres                 | 10.2.e         |                                     |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 04 - 2020 |
| Einddatum  | 01 - 04 - 2025 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Testen van een nieuw, milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Testen van een nieuw adjuvans, met minder of geen bijwerkingen, om auto-immuunziektes van het brein te modelleren in de resus makaak
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                |
|-------------|----------------|
| Naam DEC    | DEC-10.2.g     |
| Postadres   | Postbus 10.2.g |
| E-mailadres | dec@10.2.g     |



## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187 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
- bijlage 1, beschrijving dierproeven en bijlage 2, beschrijving MIMyc (+ 2 Sup. Figs)

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam	10.2.e
Functie	Adjunct Directeur
Plaats	10.2.g
Datum	2 - 3 - 2020
Handtekening	10.2.e



**Van:** 10.2.e ) namens [Info-zbo](#)  
**Aan:**  
**Bcc:** 10.2.e  
**Onderwerp:** RE: advies aanvraag projectvergunning dierproeven AVD 10.2.g  
**Datum:** vrijdag 29 mei 2020 11:01:00

---

Geachte meneer 10.2.e  
Dank voor uw advies, de stukken zijn in goede orde ontvangen.  
Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.  
Met vriendelijke groeten,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven  
10.2.e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** 10.2.e

**Verzonden:** donderdag 28 mei 2020 15:38

**Aan:** Info-zbo

**Onderwerp:** advies aanvraag projectvergunning dierproeven AVD 10.2.g

Geachte leden van de CCD,

Hierbij zend ik u het advies van de 10.2.g betreffende aanvraag projectvergunning AVD 10.2.g. Tevens zijn bijgesloten die onderdelen van de aanvraag die naar aanleiding van de vragen van de DEC gewijzigd zijn en waar dit advies dus betrekking op heeft.

Vriendelijke groeten,

10.2.e

DEC-10.2.g

10.2.g





# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

Aanvraagnummer: AVD10.2.g

1. Titel van het project: Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resusaap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie.
2. Titel van de NTS: Het testen van een nieuw adjuvant, met minder of geen bijwerkingen, om auto-immuunziektes van het brein te modelleren in resusapen.
3. Type aanvraag:
  - X nieuwe aanvraag projectvergunning
4. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: DEC-10.2.g
  - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e
  - mailadres contactpersoon: [dec@10.2.g](mailto:dec@10.2.g)
5. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 03-03-2020
  - aanvraag compleet: 04-03-2020
  - in vergadering besproken: 12-03-2020 en 09-04-2020
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 20-03-2020 tot 07-04-2020 en van 17-04-2020 tot 20-05-2020
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 07-04-2020 en 20-05-2020
  - advies aan CCD: 28-05-2020



6. 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 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.*

7. 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

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 20-03-2020 en 17-04-2020
- Gestelde vraag/vragen: Nadere onderbouwing van het belang van de studies door aanvullende informatie over de te verwachten mate van toepassing in toekomstige dierstudies. Nadere verduidelijking van de onderzoeksstrategie en het benodigd aantal dieren. Einddatum van de aanvraag (benodigde projecttijd). Enige tekstuele aanpassingen.
- Datum antwoord: 07-04-2020 en 20-05-2020
- Verstrekt(e) antwoord(en): De noodzaak om dit diermodel, evenals andere diermodellen voor auto-immuun ziektes, ook in de toekomst toe te passen en dus het belang van het verkrijgen van een milder adjuvant voor deze diermodellen is nader toegelicht. De onderzoeksstrategie is sterk aangepast. Het verkrijgen van een geschikt EAE model in niet-humane primaten met het mildere adjuvant MiMyc in Incompleet Freund's adjuvant (IFA) is



nu voorop gesteld. Er zijn 10 dieren nodig voor het bereiken van deze doelstelling. De tijdsduur van de aanvraag is aangepast van 5 naar 3 jaar.

- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. 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 (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren: De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen statistische analyse, de immunologie, neurologie, onderzoek met niet-humane primaten en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op het gebied van ontwerp van proeven, de proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, de ethiek en van proefdieren en hun bescherming. De DEC heeft ervaring met het beoordelen van experimenteel auto-immuun encephalitis (EAE)-modellen in niet-humane primaten en preklinisch onderzoek naar betere behandeling van MS.
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Er waren geen conflicterende belangen bij de beoordeling van dit voorstel.

## **C. Beoordeling (inhoud)**

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. In dit project wordt geëvalueerd of een nieuw mild adjuvant MiMyc (een combinatie van liganden in Incomplete Freund's Adjuvant, IFA) het vermogen heeft om in combinatie met het autoantigeen recombinant humaan myeline oligodendrocyte glycoproteïne (rhMOG) EAE te induceren in resusapen. Momenteel wordt hiervoor rhMOG in Compleet Freund's adjuvant (CFA) gebruikt



hetgeen serieuze bijwerkingen geeft die als “ernstig” ongerief worden geclassificeerd. Reeds eerder is vastgesteld dat MiMyc nauwelijks bijwerkingen geeft, maar wel immuunresponsen tegen lichaamsvreemde stoffen kan versterken. Voor de inductie van EAE, en ook andere auto-immuunziektes, in diermodellen zijn sterke adjuvantia nodig omdat alleen zo de tolerantie tegen autoantigenen doorbroken kan worden. In de huidige aanvraag wordt een reeds veelvuldig toegepaste proefopzet gevolgd, waarbij dieren geïmmuniseerd worden door intracutane injectie met rhMOG in IFA. Echter in plaats van het gebruikelijke adjuvant CFA wordt nu MiMyc gebruikt. De immunisatie wordt maximaal vier maal toegediend, met een maand tussentermijn, totdat een maximale EAE score van 2 wordt bereikt, zoals omschreven in een klinische scoringstabel of het eind van de studie na 120 dagen. De gekozen strategie is goed navolgbaar en volgt reeds bestaande procedures. Het aantal dieren voor deze studie is realistisch in geschat op maximaal 10. Het verwachte ongerief voor de dieren is duidelijk omschreven en de uitkomsten van dit experiment is 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. Nevendooelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorieën, te weten ‘fundamenteel’ en ‘translationeel of toegepast onderzoek’ sluiten aan bij het projectvoorstel. Enerzijds wordt onderzocht of het adjuvant MiMyc in combinatie met rhMOG inderdaad EAE kan induceren in resusapen. Anderzijds zal het op deze wijze verfijnde EAE-model kunnen worden ingezet om effectiviteit van kandidaat geneesmiddelen tegen neuro-inflammatoire aandoeningen te onderzoeken, hetgeen translationeel onderzoek betreft.

#### *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 hoofddoel van dit project is om te bepalen of met een nieuw mild adjuvant (MiMyc) in combinatie met rhMOG EAE geïnduceerd kan worden in resusapen met een incidentie van 80% of hoger, om zodoende een



bruikbaar EAE diermodel te verkrijgen voor toekomstige evaluatie van kandidaat medicijnen tegen Multiple Sclerose (MS). Het uiteindelijke doel is om voor alle huidige diermodellen voor auto-immuun ziektes het CFA, hetgeen momenteel nodig is in deze modellen maar ook ernstig ongerief geeft, te vervangen door MiMyc als milder adjuvant met weinig bijwerkingen. Zodoende wordt het ongerief dat de dieren wordt aangedaan bij de inductie van auto-immuun ziektes sterk verminderd. De betekenis van het project is gelegen in het verfijnen van onmisbare modellen om innovatieve therapieën voor MS te onderzoeken. 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 zijn de proefdieren, de samenleving en het onderzoeksveld.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door inductie van ziekte in gezonde dieren. De dieren zullen stress ondervinden en mogelijk enige mate van pijn. De toepassing van een mild adjuvant (MiMyc) voor inductie van EAE in resusapen zal leiden tot minder ongerief voor de dieren die in toekomstige experimenten zullen worden gebruikt, mogelijk niet alleen in EAE-modellen, maar ook diermodellen voor andere auto-immuun ziektes.

Het belang voor de samenleving is dat er een diermodel voor neuro-inflammatoire ziektes, zoals MS, verkregen wordt waarbij het ongerief van de dieren sterk gereduceerd is ten opzichte van de huidige diermodellen. Dit diermodel zal in de toekomst worden ingezet om nieuwe kandidaat geneesmiddelen tegen MS te testen om zodoende de behandeling van mensen met MS te verbeteren.

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie over de eigenschappen van het EAE resusaap diermodel. Met name de wijze waarop het immuunsysteem bijdraagt aan de inductie van de ziekte en mogelijk effect van het adjuvant op het beloop van de ziekte is van groot belang voor een effectieve translatie naar de mens. De uitkomsten zullen wetenschappelijk worden gepubliceerd.

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 onderzoeksgroep heeft een ruime ervaring met het onderzoek aan EAE in niet-humane primaten en het instituut heeft veel ervaring met het werken met niet-humane primaten.
  
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 in deze aanvraag beschreven proefopzet vormt een volgende stap in de ontwikkeling van MiMyc als mild adjuvant ter vervanging van CFA in auto-immuun neuro-inflammatoire diermodellen. De samenstelling van MiMyc is gebaseerd op eerder uitgevoerde *in vitro* experimenten. Vervolgens is in *in vivo* experimenten vastgesteld dat MiMyc in combinatie met IFA nauwelijks bijwerkingen geeft, maar wel een adjuvant effect heeft en dus immunresponsen tegen lichaamsvreemde stoffen kan versterken. In de huidige aanvraag wordt onderzocht of met behulp van MiMyc als adjuvant, in combinatie met het autoantigeen rhMOG, in resusapen EAE kan worden geïnduceerd met een incidentie van 80% of hoger. In een eerder experiment is na immunisatie met rhMOG in IFA zonder aanvullend adjuvant slechts een EAE inductie percentage van 40% bereikt, hetgeen onvoldoende is voor een bruikbaar EAE model. Het uiteindelijke doel van deze aanvraag is om een bruikbaar diermodel te verkrijgen voor het testen van kandidaat geneesmiddelen tegen neuro-inflammatoire ziektes als MS. EAE-inductie wordt bepaald aan de hand van een klinische score tabel die tevens dient om het humane eindpunt te bepalen. Hiermee bestaat al veel ervaring en kan er goed worden vastgesteld of een EAE-incidentie van ten minste 80% bereikt wordt. De proefopzet met herhaalde immunisaties, indien nodig, en de gekozen tijdsintervallen zijn gebaseerd op het rhMOG/IFA marmoset EAE-model en juist gekozen (AVD502002017881). De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

### *Welzijn dieren*

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



*Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden).*

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

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor het ontwikkelen van MS-gerelateerde symptomen na immunisatie met recombinant humaan MOG (rhMOG) in Compleet Freund's adjuvant (CFA). Bovendien vertoont deze diersoort zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens en is daarom eerder ingezet als diermodel voor het testen van kandidaat geneesmiddelen tegen MS. Dit diermodel is nodig voor een goede translatie naar de mens en kan met name voor therapieën die gericht zijn op het beïnvloeden van het immuunsysteem en specifiek zijn ontwikkeld voor gebruik in de mens niet vervangen worden door andere diermodellen.

Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III. Wel kunnen dieren tijdelijk alleen gehuisvest zitten, in geval een kooimaatje vanwege het bereiken van de maximale EAE score uit studie dient te worden genomen.
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 voor de dieren is correct als matig ingeschat. Het ongerief zal vooral veroorzaakt worden door injectie van het adjuvant in combinatie met rhMOG en herhaalde bloedafnames. Als EAE tot ontwikkeling komt (de beoogde uitkomst van de studie) zijn er ook ziektesymptomen te verwachten zoals spierzwakte, desoriëntatie en verminderd zicht. Dieren zullen zorgvuldig gemonitord worden en



vroegtijdig uit studie gehaald worden als de symptomen verergeren. Hierbij wordt een cumulatieve klinische EAE-scoringstabel gehanteerd. De DEC is overtuigd dat hiermee het ongerief binnen de klasse 'matig' blijft.

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 injecteren met adjuvant in combinatie met rhMOG. Deze aantasting door de handelingen wordt gevolgd door aantasting van welzijn door inductie van EAE-symptomen. Dieren zullen zorgvuldig worden gemonitord en het ongerief zal worden beperkt tot "matig" door toepassing van humane eindpunten op basis van een cumulatieve klinische scoringstabel. Alle dieren worden gedood aan het einde van het experiment voor pathologisch onderzoek.
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe. Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven (gebaseerd op algemene en specifieke criteria) en is de inschatting van de kans dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken adequaat ingeschat. Met behulp van de cumulatieve EAE-scoringstabel kan de mate van ongerief zorgvuldig worden ingeschat. Het bereiken van een humaan eindpunt is goed gedefinieerd. Dieren zullen niet onnodig lijden.
14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Bestaande *in vitro* technieken kunnen niet goed model staan voor de bij EAE horende klinische symptomen. Voor het ontstaan van EAE is een complexe interactie tussen het centrale zenuwstelsel en het immuunsysteem nodig. Daarom is voor het onderzoek naar neuro-inflammatoire ziektes, zoals MS, het gebruik van dieren onontkoombaar.
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe. De onderzoeksstrategie is naar aanleiding van vragen van de DEC sterk aangepast. Het onderzoek concentreert zich nu voornamelijk op het verkrijgen van een geschikt model voor MS in resusapen met het mildere adjuvant MiMyc. Als leidraad geldt dat EAE geïnduceerd wordt met een incidentie van 80% of hoger. Hierdoor vervalt de directe vergelijking met een minder succesvol ziekte-inductie model zonder MiMyc. Tevens, zal alleen geïmmuniseerd worden met rhMOG, omdat in eerdere experimenten hiermee een EAE inductie



van 40% bereikt werd, terwijl er geen EAE inductie optrad bij toediening van MOG peptide in IFA. Daarmee is het aantal benodigde dieren verminderd van 55 naar 10. Dit aantal is noodzakelijk om met een redelijke betrouwbaarheid vast te kunnen stellen dat de 80% ziekte inductie inderdaad wordt bereikt.

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. Het doel van deze aanvraag is verfijning van de huidige diermodellen die worden ingezet bij het evalueren van behandelingen tegen auto-immuun ziektes. De uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren. Tevens wordt in deze opzet het gebruik van CFA vermeden, dat wel in andere diermodellen voor MS wordt gebruikt. Dieren worden gedurende de gehele studie gemonitord door ervaren diervverzorgers en een klinische scorelijst wordt bijgehouden en toegepast voor het bepalen van een humaan eindpunt. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

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

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



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

*NTS*

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? Naar de mening van de DEC 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 een nieuw mild adjuvant (MiMyc) voor geschiktheid om EAE te induceren in resusapen het ongerief dat de dieren wordt aangedaan en de aantasting van hun integriteit? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren, andere onderzoekmodellen of patiënten.
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.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Het betreft dieren waarbij EAE wordt geïnduceerd, door immunisatie met het antigeen rhMOG in combinatie met het adjuvant MiMyc. De welzijnsaantasting kan resulteren in neurologische verschijnselen zoals verlamming en evenwicht/zicht problemen en de dieren kunnen pijn ondervinden. Ongerief en lijden zal zo veel mogelijk worden beperkt. Daarmee resulteert dit in maximaal matig ongerief voor de dieren. Anderzijds zal het beschikbaar komen van een mild adjuvant voor de inductie van EAE in resusapen wereldwijd dit model kunnen verfijnen. Een toekomstige opbrengst kan betekenis hebben voor auto-immuun ziektes in andere diermodellen waar het gebruik van CFA in deze modellen overbodig zou kunnen worden en daarmee belangrijk bijdragen aan vermindering van



ongerief bij dit type experimenten.

De waarde voor de samenleving is er vooral in gelegen dat voor het onderzoek en de ontwikkeling van betere medicijnen tegen neuro-inflammatoire ziektes, zoals MS, een diermodel verkregen wordt waarbij het ongerief voor de dieren sterk gereduceerd is ten opzichte van de huidige diermodellen. Dit verfijnde diermodel kan wereldwijd worden ingezet om nieuwe kandidaat geneesmiddelen tegen MS te testen om zodoende de behandeling van mensen met MS te verbeteren en daarmee ernstige chronische ziekte met sociaal-economische schade en patiëntenleed te voorkomen. Dit onderzoek is daarmee van aanmerkelijk belang in het kader van verfijning en voor toekomstige ontwikkeling voor betere medicijnen tegen MS.

De waarde voor het onderzoeksveld is toenemend wetenschappelijk inzicht in de inductie mechanismen van EAE. Voor het onderzoeksveld is van belang dat niet-humane primaten goed modelleren voor het immuunsysteem bij de mens waardoor de resultaten uit dit onderzoek goed te extrapoleren zijn naar de mens.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van een EAE-model in resusapen waarbij ernstig ongerief ten gevolge van het gebruik van CFA vermeden wordt.

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/waarden van de samenleving alsmede de proefdieren die in EAE en mogelijk andere auto-immuun ziekte modellen zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.

Het gebruik van apen is nog steeds nodig voor onderzoek naar en ontwikkeling van betere medicijnen tegen neuro-inflammatoire aandoeningen, zoals MS, evenals andere auto-immuun ziektes. De complexe interactie tussen afweersysteem en lichaamseigen componenten en de condities waaronder dit leidt tot ziekte kunnen niet afdoende *in vitro* bestudeerd worden. Alhoewel



kandidaat geneesmiddelen doorgaans eerst in knaagdiermodellen getest worden is het uiteindelijke voor de mens ontworpen medicijn vaak dermate specifiek dat het in knaagdieren niet werkt en in een aantal gevallen ook in de marmoset niet getest kan worden. Het EAE model in resusapen is daarom onontbeerlijk om dergelijk specifieke middelen te testen. Helaas is tot op heden CFA nodig voor de ziekte inductie, hetgeen gepaard gaat met ernstig ongerief. Zowel vanuit het perspectief van maatschappelijke verantwoordelijkheid als om het ongerief voor de dieren die in deze studies gebruikt worden zoveel mogelijk te beperken is het ethisch te verantwoorden om de hier beschreven experimenten met het adjuvant MiMyc uit te voeren.

De expertise voor het verrichten van deze experimenten is beschikbaar binnen de instelling en bij de betrokken onderzoekers. De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek op het gebied van EAE modellen in zowel de resusaap als de marmoset. De vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten zijn binnen het instituut aanwezig.

Naar inschatting van de DEC zijn de doelstellingen van dit project haalbaar. Er is veel voorwerk gedaan aan het te testen adjuvant, zowel in *in vitro* als *in vivo* studies. Het te gebruiken ziekte inductie model is vele malen toegepast en robuust gebleken bij gebruik van CFA als adjuvant. In bepaalde fases van het onderzoek naar nieuwe medicijnen tegen MS die een hoge specificiteit hebben voor targets die alleen bij de mens en de resusaap voorkomen is het EAE-model in resusapen onontbeerlijk. Het beschikbaar komen van een mild adjuvant voor EAE-inductie is een belangrijke verfijning binnen deze experimenten. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. De 3V-principes worden gehonoreerd door hergebruik van dieren, en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen. Het ongerief is maximaal matig. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven. De dieren worden gedood aan het eind van de studie. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing



vereist

- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
  - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
    - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
    - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
    - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn bij de beoordeling van dit project geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.





## 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](http://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	10.2.g	
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen		
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	10.2.g	
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e	
		KvK-nummer	10.2.g	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	10.2.g	
		Postbus		
		Postcode en plaats		
		IBAN		
		Tenaamstelling van het rekeningnummer		
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. Mw.
		Functie	Unithoofd	
		Afdeling	Alternatives	
		Telefoonnummer	10.2.e	
		E-mailadres	10.2.e	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. Mw.
		Functie	Afdelingshoofd	
		Afdeling	Animal Science	
		Telefoonnummer	10.2.e	
		E-mailadres	10.2.e	



- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |                |                                     |
|-----------------------------|----------------|-------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters | 10.2.e         | X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | Afdelingshoofd |                                     |
| Afdeling                    | Animal Science |                                     |
| Telefoonnummer              | 10.2.e         |                                     |
| 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 - 04 - 2020 |
| Einddatum  | 01 - 04 - 2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Testen van een nieuw adjuvant, met minder of geen bijwerkingen, om auto-immuunziektes van het brein te modelleren in resus apen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                |
|-------------|----------------|
| Naam DEC    | DEC-10.2.g     |
| Postadres   | Postbus 10.2.g |
| E-mailadres | dec@10.2.g     |



## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1389 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
- bijlage 1, beschrijving dierproeven

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondertekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	10.2 e
Functie	Adjunct Directeur
Plaats	10.2 g
Datum	- - 2020
Handtekening	





## Format

### Niet-technische samenvatting

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

### 1 Algemene gegevens

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| 1.1 Titel van het project    | Het testen van een nieuw adjuvant, met minder of geen bijwerkingen, om auto-immunziektes van het brein te modelleren in resus apen |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar; start 01-04-2020 – eind 01-04-2023   |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Verfijning, diermodel, ongerief, mild, auto-immuun ziektes   |

### 2 Categorie van het project

- |  |   |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.<br><br><i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek  |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie   |
|  | <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) | <p>Auto-immunziektes zijn aandoeningen waarbij het eigen lichaam het doelwit vormt van het immuunsysteem. Bekende voorbeelden van auto-immunziektes zijn diabetes type I, reumatoïde artritis, lupus en multipale sclerose (MS).</p> <p>Gezien de complexiteit van dit soort ziektes, waarbij verschillende typen immuun cellen in het bloed geactiveerd raken en vervolgens in een orgaan schade aanrichten, zijn proefdier modellen nog steeds noodzakelijk om het ziekteproces beter te begrijpen en om medicijnen en therapieën te kunnen testen. Ondanks dat er modellen voor menselijke auto-immunziektes in knaagdieren opgezet zijn, zijn deze niet voor alle doelstellingen geschikt. Wanneer dit het geval is, wordt er gebruik gemaakt van beter op de mens</p> |
|---|--|



gelijkende modellen in apen, zoals in resus makaken.

Wanneer in makaken auto-immuun ziektes opgewekt worden, zijn zeer sterke hulpstoffen (*adjuvantia*) zoals bijvoorbeeld Compleet Freund's adjuvant (CFA) noodzakelijk om de tolerantie voor lichaamseigen doelwitantigeen te doorbreken. Een belangrijk nadeel van CFA is dat het gebruik ervan gepaard kan gaan met ernstige bijwerkingen, zoals onderhuidse ontstekingsreacties. Deze bijwerkingen tasten het welzijn van de dieren aan en zijn mogelijk te voorkomen.

In het kader van verfijning, hebben wij een nieuw, mild adjuvant ontworpen, **MiMyc genaamd**, dat geen of zeer weinig bijwerkingen geeft. Dit project richt zich op het testen van dit nieuwe adjuvant **in een pre-klinisch resus makaak model voor MS. Het uiteindelijke doel is om CFA in dit model te vervangen en zo het niet-ziekte gerelateerde ongerief van de dieren te verminderen.**

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

Primair doel is het **verkrijgen** van een nieuw, mild adjuvant om daarmee het model voor auto-immuunziekten van het brein in de resus makaak te verfijnen en het ongerief van de dieren te verminderen. De bijwerkingen die het nu nog gebruikte adjuvant (CFA) in de resus makaak veroorzaakt zijn ernstig.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

10 resus makaken.

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

Het te testen adjuvant wordt geformuleerd en, onder narcose, intracutaan op verschillende plaatsen op de rug in kleine hoeveelheid geïnjecteerd. Te verwachten negatieve gevolgen voor het proefdier zijn sufheid en misselijkheid ten gevolge van de narcose. Daarnaast zijn er de ziekteverschijnselen behorend bij het diermodel, bijvoorbeeld het verlies van neurologische functies, waar de dieren last van zullen hebben.

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

Het cumulatieve ongerief wordt ingeschat als matig.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Alle dieren worden aan het einde van het experiment geëuthanaseerd. Om onderzoek te kunnen doen naar de pathologie in het brein en de immuunresponsen in de lymfoïde organen is dit noodzakelijk.

## 4 Drie V's

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

De samenstelling van het te testen adjuvant is volledig met behulp van proefdiervrije technologie (bioassays voor aangeboren immuunresponsen) tot stand gekomen, en ook de eerste analyses voor het mogelijk veroorzaken van bijwerkingen zijn *in vitro* gedaan.

We weten ondertussen dat het te testen adjuvant in resus makaken 1) zeer weinig tot geen lokale bijwerkingen geeft en 2) wel immuunresponsen stimuleert. We weten nog niet of deze stimulatie ook voldoende is om een auto-immuunziekte te kunnen laten ontstaan, en dat is wel nodig wil het adjuvant CFA kunnen vervangen. Helaas is het nog niet mogelijk om op een proefdiervrije manier auto-immuunziekten na te kunnen bootsen. In het geval van ontstekingen van het brein (zoals bij MS) wordt dit veroorzaakt door complexe interacties tussen het brein en het gehele afweersysteem en



zeer waarschijnlijk ook door omgevingsinvloeden en levensstijlen. Bestaande proefdiervrije alternatieven kunnen deze interacties –nog- niet nabootsen.

4.2 **Vermindering**

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

Dit is een *proof-of-principle* studie. **Het minimum aantal dieren dat nodig is om met een redelijke mate van betrouwbaarheid vast te kunnen stellen dat een ziekte incidentie van 80% of hoger geïnduceerd wordt -het criterium ter bepaling of MiMyc een geschikte vervanging van CFA is- is 10 dieren.**

4.3 **Verfijning**

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

De belangrijkste doelstelling van dit project **is** verfijning van een diersmodel voor auto-immuunziekten van het brein in de resus makaak. De noodzaak tot vervanging van CFA is groot in de resus makaak, gezien de heftigheid van de bijwerkingen in deze diersoort. Toch wordt dit model nog met regelmaat en wereldwijd gebruikt waardoor de impact van een nieuw milder adjuvant op dierenwelzijn groot zal zijn. **Resultaten van dit onderzoek zullen middels publicatie beschikbaar gemaakt worden voor de internationale onderzoeksgemeenschap.**

Ontwikkeling van een bijwerkingsvrij of bijwerkingsarm, maar toch potent, adjuvant zou op termijn mogelijk ook in modellen voor auto-immuunziekten in andere diersoorten (zoals in ratten, muizen en cavia's) tot verfijning kunnen leiden alhoewel daarvoor eerst proeven in de betreffende diersoorten nodig zullen zijn.

Tijdens de experimenten wordt onnodig ongerief vermeden door het gebruik van sedatie/pijnstilling.

Bij het bereiken van een van tevoren gesteld humane eindpunt worden de dieren geëuthanaseerd.

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

Training van dieren, sedatie en/of narcose, dagelijkse observatie, euthanasie op basis van humane eindpuntcriteria.

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 10.2.e
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in. Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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



- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

### **Auto-immuunziektes**

Auto-immuunziektes vormen een scala aan, vaak chronische, aandoeningen waarbij onderdelen van het eigen lichaam het doelwit vormen van het immuunsysteem. Bekende voorbeelden van auto-immuunziektes zijn coeliakie, diabetes type I, reumatoïde artritis, myasthenia gravis, systemische lupus erythematoses en multipole sclerose (MS). **Veel auto-immuunziektes zijn nog maar beperkt behandelbaar en de frequentie van dit soort aandoeningen neemt met name in de welvarende landen toe.** Om deze ziektes beter te leren begrijpen, alsmede om therapeutica in preklinische fases te kunnen testen, zijn goede diermodellen nog steeds onontbeerlijk.

### **MS**

MS is een zeer ernstige, veelal chronische aandoening die de zenuwbanen in het centrale zenuwstelsel (CZS) aantast. De ziekte treft vooral jong volwassenen met een incidentie van 1 op 1000. MS is daarmee na trauma de belangrijkste neurologische ziekte in jong volwassenen. Er zijn circa 17.000 MS patiënten in Nederland en de jaarlijkse kosten voor behandeling en zorg bedragen tussen de 9.000 en 45.000 EUR per patiënt, afhankelijk van de behandeling [1].

De meest voorkomende symptomen zijn ernstige vermoeidheid, tijdelijke blindheid, verminderde mobiliteit, spierzwakte, incontinentie, stijfheid, en onhandigheid en slepen van de benen (meestal asymmetrisch). Uiteindelijk kan de ziekte leiden tot gedeeltelijke of gehele verlamming van de ledematen. Naast motorische problemen ontstaan er ook problemen met geheugen en concentratie, de zogeheten cognitieve problemen [2, 3]. Patiënten met gevorderde MS hebben een sterk verminderde kwaliteit van leven, moeten al snel stoppen met werken en alhoewel MS in het algemeen niet dodelijk is, kunnen MS patiënten wel eerder overlijden als gevolg van infecties, zoals een longontsteking. In ongeveer 80% van de gevallen begint de ziekte met een relapsing-remitting (RR-MS) beloop waarbij episodes met neurologische klachten (relapses) alterneren met gedeeltelijk of zelfs geheel herstel (remissies). Rond de leeftijd van 40 jaar neemt de ziekte meestal een progressief beloop (secundair progressieve MS, SP-MS) en vindt er nauwelijks herstel meer plaats. In een minderheid van de patiënten openbaart de ziekte zich vanaf het begin als progressief (primair progressieve MS, PP-MS). Wat er precies gebeurt bij de overgang van RR naar SP-MS, of welke factoren daar een rol bij spelen is nog onbekend en is een belangrijk onderwerp van onderzoek [4].

Op dit moment zijn er 14 therapieën officieel goedgekeurd voor het behandelen van RR-MS. Dit zijn **biologicals en small molecules als interferon (IFN)-beta en fingolimod**, en antilichamen die leiden tot B-cel depletie (zoals rituxumab) of die de migratie van lymfocyten naar de hersenen blokkeren (zoals natalizumab). Deze therapieën richten zich op het remmen van de ontstekingsactiviteit van het perifere immuunsysteem, en zijn ook bewezen effectief in de diermodellen voor MS. Het ziektebeloop kan met deze aanpak sterk worden geremd, maar de patiënt kan niet worden genezen aangezien de myeline-laag en de zenuwcellen onherstelbaar beschadigd zijn. De huidige therapieën werken in een deel van de patiënten met RR-MS [7] en hebben geen of nauwelijks effect in de progressieve fase van MS. Tevens kunnen er ernstige bijwerkingen ontstaan, zoals reactivatie van virussen en autoimmuun-reacties gericht tegen bijvoorbeeld de schildklier, die langdurige behandeling in de weg staan. Daarom zullen ook de komende jaren nieuwe therapieën tegen MS ontwikkeld en getest moeten worden. Voor de progressieve vormen van MS (SP-MS en PP-MS) is er pas één medicijn beschikbaar [8]. Dit komt omdat de pathogene mechanismes die tijdens progressieve MS belangrijk zijn nog onbekend zijn en een goed diermodel nog ontbreekt.

### **Waarom onderzoek in de niet-humane primate?**

MS is een aandoening die veroorzaakt wordt door complexe interacties tussen het CZS en het gehele afweersysteem. De meeste geneesmiddelen grijpen ook in op deze interacties. Met de huidige stand van proefdiervrije alternatieven is het helaas -nog- niet mogelijk om buiten het levend dier kennis te vergaren over deze interacties of om het effect van geneesmiddelen te bestuderen. Wanneer mogelijk zullen altijd proefdiervrije alternatieven ingezet worden en zullen kandidaat-geneesmiddelen bv. eerst of alleen in knaagdieren getest worden. Er zijn echter situaties waarin niet-humane primaten (NHP) ingezet



moeten worden. Het pathologisch proces dat onderzocht wordt of waarop de therapie aangrijpt, kan bv. in knaagdieren biologisch verschillend zijn van primaten of zelfs compleet afwezig zijn. Ook is het met de huidige technologieën mogelijk om geneesmiddelen steeds specifiek voor de mens te ontwerpen, waardoor ze in knaagdieren hun aangrijpingspunt niet meer herkennen en vaak in apen nog wel.

#### **Diermodellen en adjuvantia**

Er zijn verschillende modellen voor auto-immuun geïnduceerde, neuroinflammatoire aandoeningen (zoals MS) opgezet in twee apensoorten die ingezet worden om fundamentele vragen te adresseren en om kandidaat geneesmiddelen te testen. Grofweg kan gesteld worden dat er een model is dat geschikt is om de chronische inflammatie fase tijdens MS na te bootsen in de marmoset (*Callithrix jacchus*), en een model in de resus makaak (*Macaca mulatta*) dat gepaard gaat met een zich vrij acuut ontwikkelende inflammatie van het brein, en dat daarmee meer lijkt op de acute inflammatie fase tijdens MS.

Cruciaal bij het ontwikkelen van relevante diermodellen voor menselijke auto-immuunziektes is dat de natuurlijke tolerantie van het immuunsysteem voor lichaamseigen producten doorbroken moet worden. Vaak worden om dit te bewerkstelligen hulpstoffen (*adjuvantia*) gebruikt, die het immuunsysteem stimuleren om tegen het gewenste antigeen te reageren. Wanneer in diermodellen auto-immuunziektes opgewekt worden, zijn zeer sterke adjuvantia zoals bijvoorbeeld Compleet Freund's Adjuvant (CFA) noodzakelijk om de tolerantie te doorbreken. In zowel de marmoset als in de resus makaak is het model daarom oorspronkelijk opgezet met CFA als adjuvant. Een belangrijk nadeel van CFA is dat het gebruik ervan gepaard kan gaan met de ontwikkeling van serieuze bijwerkingen, zoals onderhuidse granuloma's. Deze adjuvant-gerelateerde bijwerkingen verhogen het ongerief dat de dieren ondervinden, en zijn mogelijk anderszins te voorkomen.

In de marmoset is er de afgelopen twee decennia veel werk verricht om het model te verfijnen door middel van het gebruik van andere antigenen alsmede door te immuniseren in het mildere Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). Dit heeft geleid tot een verfijnd model, dat helaas ook kwetsbaar is gebleken voor minimale veranderingen zoals veranderingen in het dieet [39]. De robuustheid van het model om met voldoende statistische betrouwbaarheid preklinisch onderzoek te doen is hiermee enigszins onder druk komen te staan.

In de resus makaak is het model wel robuust, maar is er nog geen alternatief voor het gebruik van CFA. Pogingen om een adjuvant-vrij model in de resus makaak te ontwikkelen zijn tot nu toe vruchteloos gebleken, en ook het gebruik van andere antigenen heeft nog niet geleid tot een terugdringing van het ongerief. De in de resus makaak optredende bijwerkingen ten gevolge van het gebruik van CFA zijn relatief ernstig in vergelijking met andere diersoorten, en er is er dus een sterke behoefte aan een mild, bijwerkingsarm adjuvant.

Binnen het instituut is de afgelopen jaren gewerkt aan adjuvant ontwikkeling met als doel om adjuvantia te maken die weinig of geen bijwerkingen geven maar die toch een sterk stimulerend effect op het immuunsysteem sorteren. Eén van deze adjuvantia, genaamd MiMyc, is ondertussen uitvoerig getest op de afwezigheid van bijwerkingen en op de aanwezigheid van immuunstimulerende effecten in de resus makaak (zie onder), en is een veelbelovende kandidaat om CFA te vervangen en daarmee het ongerief voor de dieren te verminderen. Dit projectvoorstel vormt daarmee het sluitstuk in een langlopende inspanning om CFA in het EAE model in de resus makaak te vervangen.

#### **Het experimenteel auto-immuun encephalitis (EAE) model in meer detail**

Eén van de best gekarakteriseerde diermodellen voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie is EAE. Het model is ontwikkeld in ratten, muizen en NHP [9, 10]. Het EAE model in de muis heeft in belangrijke mate bijgedragen aan de huidige inzichten in de ziekte mechanismes van MS en er zijn diverse therapieën ontwikkeld die gebruikt worden voor de behandeling van RR-MS. Een voorbeeld daarvan is het monoclonale antilichaam natalizumab, dat de entree van immuuncellen in het CNS blokkeert. Er is echter ook een lange lijst van aanvankelijk veelbelovende kandidaat geneesmiddelen die de vertaling van de muis naar de mens niet hebben overleefd vanwege onverwachte toxiciteit of afwezigheid van werkzaamheid. Het wordt in toenemende mate duidelijk dat het EAE model in de muis zeker bruikbaar is voor fundamenteel onderzoek aan bepaalde facetten van MS, met name de rol van ontstekingscellen, maar dat het door de afwezigheid van immunologische mechanismes die werkzaam zijn in de chronische fase van MS niet optimaal bruikbaar is voor geneesmiddelontwikkeling. In bepaalde



belangrijke opzichten verschilt het EAE model in de muis van MS. De laesies bevinden zich b.v. alleen in het ruggenmerg, terwijl in MS vooral ook de hersenen zijn aangetast. Tevens lijken deze laesies qua complexiteit niet goed op de laesies in MS patiënten en lijkt oxidatieve stress afwezig te zijn [11]. Ook zijn er verschillen betreffende de immuun mechanismen die tijdens het ziektebeloop belangrijk zijn: in het EAE model in de muis spelen voornamelijk de CD4+ T-helper cellen een rol, terwijl in MS CD8+ killer T cellen zeker ook betrokken zijn.

EAE modellen in NHP lijken in immunologisch en pathologisch opzicht meer op de mens. Het EAE model in de marmoset heeft zich in de afgelopen twintig jaar ontwikkeld tot een zeer bruikbaar preklinisch model voor MS [12, 13, 14-16]. Het diermodel deelt een aantal eigenschappen met progressieve MS, namelijk het chronische ziekteverloop en de ontwikkeling van laesies in zowel de witte als grijze stof, en kan voor beantwoording van onderzoeksvragen of geneesmiddelontwikkeling ingezet worden.

Het EAE model in de resus makaak heeft met de marmoset gemeen dat de pathologie in de hersenen plaats vindt en dat deze in bepaalde aspecten gelijkend aan is aan die in MS. Het EAE model in de resus makaak wordt gebruikt als preklinisch model voor MS, waarbij het vooral bruikbaar is om de acute inflammatie fase te modelleren. Nataluzimab, een medicijn dat goedgekeurd is voor gebruik in RR-MS en de acute inflammatie fase blokkeert, blokkeert dan ook de ontwikkeling van EAE in de resus makaak [22], en nieuwe therapieën voor MS worden ook in dit model getest [23]. In de resus makaak is het ziekteverloop echter acuter en gaat het vergezeld van ernstigere pathologie in de hersenen dan in de marmoset. Naast preklinische studies die zich richten op de acute fase van MS, wordt het diermodel ook gebruikt om fundamentele vragen te beantwoorden die zich richten op de processen die bepalend zijn bij de overgang van acute naar chronische neuroinflammatie.

Zoals al genoemd wordt het EAE model in de resus makaak nog altijd geïnduceerd met behulp van CFA. Voor de inductie wordt het meest regelmatig gebruikt gemaakt van twee antigenen, recombinant humaan myeline oligodendrocyte glycoproteïne (rhMOG) [21], of een peptide daarvan, MOG34-56 [17, 18]. Er is in resus apen nog geen alternatief voor CFA. Immunisatie met rhMOG in IFA leidde b.v. tot EAE in slechts twee van de vijf resus makaken [19], en immunisatie met MOG34-56 peptide in IFA van vijf resus makaken leidde helemaal niet tot klinische effecten (niet gepubliceerd). Deze incidenties zijn te laag voor gebruik in preklinische of fundamentele studies.

Voor preklinische vraagstellingen die betrekking hebben op de chronische inflammatie fase van MS, is de marmoset het model van keuze. Voor preklinische vraagstellingen die betrekking hebben op de acute inflammatie fase van MS, hangt de keuze af van meerdere factoren. Soms is de marmoset b.v. niet geschikt omdat het medicijn niet kruisreageert met het target in marmosets of als er technische beperkingen zijn (b.v. als grote bloed of cerebrospinale vloeistof volumes nodig zijn). Ook kan het zijn dat een kortdurend model gewenst is, omdat de tijd dat een medicijn zijn werk kan doen beperkt is door vorming van neutraliserende antilichamen. Voor studies van fundamentele aard, hangt de keuze van het model af van de specifieke vraagstelling en hebben beide modellen hun eigen voor- en nadelen.

Er is aanzienlijke vraag naar het EAE model, ook in de resus makaak waar op dit moment geen alternatief beschikbaar is voor het gebruik van CFA. Ondanks dat er de afgelopen jaren vooruitgang is geboekt m.b.t. het beschikbaar komen van disease modifying therapies (DMT) voor relapsing remitting multiple sclerosis (rr-MS), is er nog geen enkele DMT voor de veel acutere vorm van MS, primary progressive MS (pp-MS). **EAE in de resus makaak lijkt het meest op juist deze laatste vorm van MS.**

Het gebruik van CFA voor EAE inductie beperkt zich niet tot Nederland, maar ook in labs in China, Japan, Frankrijk, Israël en de Verenigde Staten is dit het standaardprotocol [40-48]. De noodzaak tot het gebruik van CFA in het resus model veroorzaakt veel ongerief bij de dieren, **en is daarom een doelwit voor verfijning**. Binnen het instituut is een *in vitro* onderzoeksprogramma opgezet om nieuwe, mildere adjuvantia te ontwikkelen die minder of geen bijwerkingen hebben maar toch effectief zijn. **Een dergelijk adjuvant is nu ontwikkeld en *in vivo* in resus makaken getest op afwezigheid van bijwerkingen en aanwezigheid van adjuvantiteit (zie hieronder)**. Nog onduidelijk is of de adjuverende werking ook sterk genoeg is om tolerantie tegen lichaamseigen antigenen te doorbreken en



daarmee een auto-immuunrespons te genereren die uiteindelijk resulteert in orgaan-specifieke pathologie. **Dit voorstel richt zich daarom op het uitvoeren van de proof-of-principle studie om dit mildere adjuvant te testen op functionaliteit in een EAE inductie protocol in de resus makaak.**

### MiMyc in meer detail

De samenstelling van het *in-huis* ontwikkelde adjuvant MiMyc is volledig gebaseerd op *in vitro* experimenten. De stimulerende werking van adjuvantia op het adaptieve immuunsysteem verloopt voor een groot deel via activatie van receptoren van het aangeboren immuunsysteem. Om de aangeboren immuunrespons die de Mycobacteria die zich in CFA bevinden normaliter induceert in kaart te brengen, hebben wij bioassays ontwikkeld. Deze hebben ons in staat gesteld om zowel in kwalitatief als kwantitatief opzicht de aangeboren immuunrespons die CFA induceert na te bootsen met een mix van specifieke liganden, die wij geformuleerd hebben in IFA en die eventueel uitstekend doseerbaar is (Tabel 1).

Formulering	Samenstelling	Bijwerkingen	EAE inductie% met rhMOG
IFA	Water-in-olie	Nee	+/- 40%
MiMyc	IFA + verschillende liganden	Nee	?
CFA	IFA + hitte gedode <i>M. butyricum</i>	Ja	100%

**Tabel 1.** Het verband tussen IFA, MiMyc en CFA.

Vervolgens hebben we een *in vivo* experiment uitgevoerd met als doel om de bijwerkingen van MiMyc in kaart te brengen. De experimentele setup was zo gekozen dat het mogelijk was om ook de effecten van de aan- of afwezigheid van een antigeen te evalueren, evenals het effect van herhaaldelijk immuniseren. De toevoeging van antigeen aan de adjuvant preparaten, heeft ons ook in staat gesteld om geïnduceerde antigeen-specifieke (zowel B-(antilichaam) als T-cel) responsen in het bloed te meten.

Samenvattend geven de gegevens aan dat MiMyc een doseerbaar adjuvant is dat -ook in de hoogst geteste dosis, met toevoeging van antigeen en na herhaaldelijk toedienen- minimale bijwerkingen geeft (niet groter dan immunisatie in IFA). Daarnaast induceert immunisatie met antigeen in MiMyc een sterke specifieke antilichaam respons, en goed meetbare specifieke T cel responsen. Deze responsen zijn duidelijk superieur aan de responsen zoals gevonden na immunisatie met IFA, maar minder robuust dan die gevonden na immunisatie met CFA. Of deze responsen voldoende zijn om tot inductie van EAE te leiden is nog onduidelijk en onderwerp van dit voorstel.

**Mocht MiMyc geschikt bevonden worden om CFA te vervangen in EAE inductieprotocollen bij de resus makaak, dan zal daarmee het ongerief dat de dieren ondervinden tijdens de inductiefase van de ziekte - de ontwikkeling van chronische granulomateuze onderhuidse ontstekingen- zeer sterk afnemen.**

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Dit project richt zich op de evaluatie van een mild adjuvant om het model voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie in de resus makaak te induceren. Het doel is om in de resus makaak CFA te vervangen door een adjuvant dat minder of geen bijwerkingen geeft, maar dat wel leidt tot auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie. Dit in het kader van Verfijning.

De noodzaak van vervanging van CFA in EAE inductie protocollen in makaken beperkt zich niet ons instituut want ook in labs in China, Japan, Frankrijk, Israël en de Verenigde Staten is dit nog steeds het



standaardprotocol [40-48]. De afgelopen vijf jaar worden er gemiddeld eens per jaar resultaten van een grote studie met makaken aan het openbare domein toevertrouwd [45-48]. Studies die plaats hebben gevonden binnen contract research organizations of de farmaceutische industrie worden niet noodzakelijkerwijs allemaal gepubliceerd, en een conservatieve schatting is dat vervanging van CFA voor tussen de 40 en 100 makaken op jaarbasis een aanzienlijke verfijning zou betekenen. **Resultaten van deze studie zullen middels publicatie gedeeld worden met het internationale onderzoeksveld.**

Alhoewel niet het doel van deze studie, zou het gebruik van een milder adjuvant om de ziekte te induceren mogelijk een ander EAE ziektebeloop ten gevolge kunnen hebben. Dit zou de bruikbaarheid van het model om wetenschappelijke vragen waarin meer chronische ontstekingsprocessen onderzocht worden, ten goede kunnen komen. Mogelijkerwijs zou MiMyc ook in knaagdiermodellen voor auto-immuunziekten CFA kunnen vervangen. Onderzoek hiernaar zal echter in apart uitgevoerd dienen te worden, gezien er geen enkele garantie is dat resultaten in de resus makaak zich direct laten vertalen naar knaagdieren. Dit geldt overigens ook omgekeerd. Het eerst testen van MiMyc in andere diersoorten biedt ons geen extra informatie mbt. evt. activiteit in de resus makaak. We weten al dat MiMyc *in vivo* in de resus makaak adjuvant activiteit bezit, en dit zal eerst in knaagdiermodellen bevestigd dienen te worden. Mocht dit niet bevestigd worden, dan is er een discrepantie tussen knaagdieren en resus makaken en zijn verdere testen in het knaagdiermodel uberhaupt niet zinvol. Mocht dit wel bevestigd worden, dan zal een evt. succesvolle EAE inductie in knaagdiermodellen toch gevolgd dienen te worden door een *proof-of-principle* studie in de resus makaak. Onafhankelijk van de uitkomst van proeven in andere diersoorten ziet het traject om te testen of MiMyc ook in resus makaken CFA kan vervangen er dus exact hetzelfde uit.

Het instituut waar dit onderzoek zal worden uitgevoerd heeft in de afgelopen 20 jaar grote expertise opgebouwd op het gebied van EAE modellen in zowel de resus makaak als de marmoset. Het EAE model in de resus makaak is gebruikt voor het testen van natalizumab, een goedgekeurd medicijn voor de behandeling van MS [22], en van een antilichaam tegen CD28 [23]. Verder is in dit model ook gevonden dat auto-immuun responsen die zich richten op oligodendrocyte specifiek protein, specifieke oog-gerelateerde klinische verschijnselen kunnen veroorzaken die sterk lijken op de verschijnselen bij optische neuritis, een aandoening die vaak optreedt voordat de diagnose MS wordt gesteld [38]. Het EAE model in de marmoset is gebruikt voor het testen van IFN-gamma [24] en antilichamen tegen interleukine (IL)-12p40 [25, 26], cluster of differentiation (CD)40 [27, 28], IL-17A [29], CD20 [30-32], IL-7 receptor (CD127) [33] en tegen de B-cel groeifactoren BLYS en April [34]. Tevens is onderzocht of tolerantie geïnduceerd kan worden met een fusie eiwit dat gebruik maakt van het cholera toxine subunit en een Ig bindende regio van staphylococcus aureus proteïne [35]. Tenslotte is het model gebruikt om de haalbaarheid van stamcel therapie te onderzoeken [36, 37].

Het instituut waar deze studies zullen worden uitgevoerd heeft de beschikking over een grote fokkolonie van resus makaken. Op het instituut is de infrastructuur en de expertise aanwezig om deze studies veilig, op DM-2 en ML-2 niveau, en binnen de gestelde termijn uit te kunnen voeren.

## Referenties

1. Adelman, G. et al. (2013) The cost burden of multiple sclerosis in the United States: a systematic review of the literature. *J Med Econ* 16 (5), 639-47.
2. Compston, A. and Coles, A. (2002) Multiple sclerosis. *Lancet* 359 (9313), 1221-31.
3. Compston, A. and Coles, A. (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372 (9648), 1502-17.
4. Lassmann, H. (2013) Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 333 (1-2), 1-4.
5. Pender, M.P. and Burrows, S.R. (2014) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: potential opportunities for immunotherapy. *Clin Transl Immunology* 3 (10), e27.
6. Vanheusden, M. et al. (2015) Cytomegalovirus: a culprit or protector in multiple sclerosis? *Trends Mol Med* 21 (1), 16-23.
7. Bertolotto, A. and Gilli, F. (2008) Interferon-beta responders and non-responders. A biological approach. *Neurol Sci* 29 Suppl 2, S216-7.



8. Montalban, X. et al. (2017) Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. *N Engl J Med* 376 (3), 209-220.
9. Gold, R. et al. (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129 (Pt 8), 1953-71.
10. Friese, M.A. et al. (2006) The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain* 129 (Pt 8), 1940-52.
11. Schuh, C. et al. (2014) Oxidative tissue injury in multiple sclerosis is only partly reflected in experimental disease models. *Acta Neuropathol* 128 (2), 247-66.
12. 't Hart, B.A. et al. (2012) The marmoset monkey: a multi-purpose preclinical and translational model of human biology and disease. *Drug Discov Today* 17 (21-22), 1160-5.
13. Mansfield, K. (2003) Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comp Med* 53 (4), 383-92.
14. Kap, Y.S. et al. (2010) Experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset, a bridge between rodent EAE and multiple sclerosis for immunotherapy development. *J Neuroimmune Pharmacol* 5 (2), 220-230.
15. 't Hart, B.A. et al. (2015) The primate autoimmune encephalomyelitis model; a bridge between mouse and man. *Ann Clin Transl Neurol* 2 (5), 581-93.
16. Kap, Y.S. et al. (2016) The common marmoset as an indispensable animal model for immunotherapy development in multiple sclerosis. *Drug Discov Today* 21 (8), 1200-5.
17. Kerlero de Rosbo, N. et al. (2000) Rhesus monkeys are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein: characterisation of immunodominant T- and B-cell epitopes. *J Neuroimmunol* 110 (1-2), 83-96.
18. Brok, H.P. et al. (2007) The human CMV-UL86 peptide 981-1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide 34-56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys. *J Neuroimmunol* 182 (1-2), 135-52.
19. Haanstra, K.G. et al. (2013) Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis with recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein in incomplete Freund's adjuvant in three non-human primate species. *J Neuroimmune Pharmacol* 8 (5), 1251-64.
20. 't Hart, B.A. et al. (2005) Non-human primate models of experimental autoimmune encephalomyelitis: Variations on a theme. *J Neuroimmunol* 168 (1-2), 1-12.
21. Peschl, P. et al. (2017) Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: Deciphering a Target in Inflammatory Demyelinating Diseases. *Front Immunol* 8, 529.
22. Haanstra, K.G. et al. (2013) Antagonizing the alpha4beta1 integrin, but not alpha4beta7, inhibits leukocytic infiltration of the central nervous system in rhesus monkey experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 190 (5), 1961-73.
23. Haanstra, K.G. et al. (2015) Selective blockade of CD28-mediated T cell costimulation protects rhesus monkeys against acute fatal experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 194 (4), 1454-66.
24. Jagessar, S.A. et al. (2012) Discrepant effects of human interferon-gamma on clinical and immunological disease parameters in a novel marmoset model for multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 7 (1), 253-65.
25. Brok, H.P. et al. (2002) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets using an anti-IL-12p40 monoclonal antibody. *J Immunol* 169 (11), 6554-63.
26. 't Hart, B.A. et al. (2005) Suppression of ongoing disease in a nonhuman primate model of multiple sclerosis by a human-anti-human IL-12p40 antibody. *J Immunol* 175 (7), 4761-8.
27. Laman, J.D. et al. (2002) Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12). *Eur J Immunol* 32 (8), 2218-28.
28. 't Hart, B.A. et al. (2005) Treatment with chimeric anti-human CD40 antibody suppresses MRI-detectable inflammation and enlargement of pre-existing brain lesions in common marmosets affected by MOG-induced EAE. *J Neuroimmunol* 163 (1-2), 31-9.
29. Kap, Y.S. et al. (2011) Effects of early IL-17A neutralization on disease induction in a primate model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 6 (3), 341-53.
30. Kap, Y.S. et al. (2011) B-cell depletion attenuates white and gray matter pathology in marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 70 (11), 992-1005.
31. Kap, Y.S. et al. (2010) Late B cell depletion with a human anti-human CD20 IgG1kappa monoclonal antibody halts the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in marmosets. *J Immunol* 185 (7), 3990-4003.



32. Jagessar, S.A. et al. (2012) B-cell depletion abrogates T cell-mediated demyelination in an antibody-nondependent common marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J Neuropathol Exp Neurol* 71 (8), 716-728.
33. Dunham, J. et al. (2016) Blockade of CD127 exerts a dichotomous clinical effect in marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 11 (1), 73-83.
34. Jagessar, S.A. et al. (2012) Antibodies against human BLYS and APRIL attenuate EAE development in marmoset monkeys. *J Neuroimmune Pharmacol* 7 (3), 557-70.
35. Kap, Y.S. et al. (2015) Immune modulation by a tolerogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)10-60 containing fusion protein in the marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis model. *Clin Exp Immunol* 180 (1), 28-39.
36. Pluchino, S. et al. (2009) Human neural stem cells ameliorate autoimmune encephalomyelitis in non-human primates. *Ann Neurol* 66 (3), 343-54.
37. Thiruvalluvan, A. et al. (2016) Survival and functionality of human induced pluripotent stem cell-derived oligodendrocytes in a nonhuman primate model for multiple sclerosis. *Stem Cells Transl Med* 5 (11), 1550-1561.
- 10.2.e
39. Kap, Y.S. et al. (2018) Targeted Diet Modification Reduces Multiple Sclerosis-like Disease in Adult Marmoset Monkeys from an Outbred Colony. *J. Immunol.* 201(11), 3229-3243.
40. Stimmer L. et al. (2018) Experimental Models of Autoimmune Demyelinating Diseases in Nonhuman Primates. *Vet Pathol.* 55(1):27-41.
41. Jones J.M. et al. (2008) Monkeypox virus viral chemokine inhibitor (MPV vCCI), a potent inhibitor of rhesus macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine.* 43(2):220-8.
42. Teitelbaum D. et al. (2004) Oral glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis: clinical and immunological studies. *Ann N Y Acad Sci.* 1029:239-49.
43. Hu H. et al. (1997) Depletion of T lymphocytes with immunotoxin retards the progress of experimental allergic encephalomyelitis in rhesus monkeys. *Cell Immunol.* 10;177(1):26-34.
44. Rose L.M. et al. (1994) Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in nonhuman primates: a model of multiple sclerosis. *Lab Anim Sci.* 44(5):508-12.
45. Curtis 2<sup>nd</sup> A.D. et al. (2014) The extracellular domain of myelin oligodendrocyte glycoprotein elicits atypical experimental autoimmune encephalomyelitis in rat and Macaque species. *PLoS One.* 10;9(10):e110048. doi: 10.1371/journal.pone.0110048. eCollection 2014. Erratum in: *PLoS One.* 2015;10(2):e0117878.
46. Inaba S.I. et al. (2016) Evaluation of species difference in peripheral lymphocyte reduction effect of CS-0777, a sphingosine 1-phosphate receptor modulator, based on a pharmacokinetic/pharmacodynamic model analysis. *Biopharm Drug Dispos.* 37(9):561-573.
47. Peng Z. et al. (2018) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Model of Cynomolgus Macaques Induced by Recombinant Human MOG1-125 (rhMOG1-125) Protein and MOG34-56 Peptide. *Protein Pept Lett.* 24(12):1166-1178.
48. Fovet C.M. et al. (2019) Intradermal vaccination prevents anti-MOG autoimmune encephalomyelitis in macaques. *EBioMedicine.* 47:492-505.

### 3.3 Belang

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

#### Wetenschappelijk

Een hoog percentage kandidaat geneesmiddelen overleeft de vertaling van diermodel naar MS patiënt niet (>90% voor RR-MS en 100% voor SP- en PP-MS). Een belangrijke oorzaak daarvoor is de kloof tussen de in het preklinisch onderzoek veel gebruikte EAE modellen in knaagdieren en de MS patiënt. De EAE modellen in NHP worden algemeen beschouwd als een relevante overbrugging van deze kloof. De vertaalbaarheid van resultaten verkregen in EAE modellen in knaagdieren wordt negatief beïnvloed door het feit dat alle dieren genetisch zeer nauw verwant zijn (inbred), dat de dieren specific-pathogen free (SPF) gehuisvest zijn (waardoor hun immuunsysteem anders uitrijpt dan wanneer er een normale blootstelling is aan virussen en bacteriën), dat er aanmerkelijke verschillen zijn in de neuropathologie met MS, en dat er een grote genetische afstand is met de mens. EAE modellen in non-SPF, outbred NHP vertonen enerzijds grote immunologische overeenkomsten met MS, anderzijds vertonen ze ook grote neuropathologische overeenkomsten met MS. Onderzoek in NHP modellen kan bv. nieuwe inzichten



verschaffen in de overgang van de relapsing-remitting naar de progressieve fase van de ziekte, waarvoor op dit moment nog geen enkele effectieve medicatie bestaat. Optimalisatie van de modellen in NHP is daarbij wel noodzakelijk. Vooral vanuit het oogpunt van dierenwelzijn, waarbij het gebruik van CFA ongerief veroorzaakt dat niet ziekte-gerelateerd is. Daarnaast is het zo, alhoewel dat niet het doel is van dit project, dat een milder adjuvant ook mogelijkheden kan bieden om het acute verloop van het rhesus EAE model te temperen, om daarmee het model ook voor andere toepassingen geschikt te maken.

### **Maatschappelijk**

Het maatschappelijk belang van dit project is tweeledig en betreft zowel dier als mens.

Voor de t.b.v. de mens ingezette dieren hebben wij de maatschappelijke verantwoordelijkheid om het ongerief zo klein mogelijk te maken. Vervanging van CFA in het EAE model in de resus makaak door een milder adjuvant met minder of geen bijwerkingen zou het niet-ziekte gerelateerde ongerief voor de dieren sterk reduceren: een aanzienlijke verfijning. Daarnaast is het zo dat een succesvolle vervanging van CFA in het resus EAE model ook aanleiding zou kunnen geven voor onderzoek naar de mogelijke vervanging van CFA in modellen voor auto-immuunziektes in andere diersoorten, zoals b.v. EAE in marmosets, ratten en muizen en collageen-geïnduceerde artritis in ratten. Het is daarbij nog onduidelijk hoe goed resultaten uit de resus makaak zich laten vertalen naar andere species, en *vice versa*.

Voor de mens is iedere vooruitgang in de behandelingsmogelijkheden van MS een sprong voorwaarts. In Nederland treft de diagnose MS ongeveer 1 op de 1000 mensen. De jaarlijkse kosten voor de zorg en behandeling van deze 17.000 mensen liggen tussen 500 en 700 miljoen euro. De ziekte treft vooral jong-volwassenen en is, na trauma, de belangrijkste oorzaak van neurologische ziekte in jong-volwassenen.

**Tezamen vormt dit een aanzienlijk economisch belang.**

MS heeft een enorme impact op de maatschappelijke participatie (werk/sociale contacten) en leidt tot een sterk verminderde kwaliteit van leven. Er is dringend behoefte aan een veilige en effectieve behandeling van MS. De huidige therapieën die ontwikkeld zijn tegen MS werken in een deel van de RR-MS patiënten, maar zijn helaas niet werkzaam in patiënten met SP-MS of PP-MS. Tevens hebben de huidige therapieën veel bijwerkingen zoals terugkerende infecties die langdurig gebruik in de weg staan. Omdat de ziekte een ernstig verloop heeft met blijvende invaliditeit is het zeer belangrijk dat de ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen MS blijft doorgaan.

## **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

Het uiteindelijke doel van het project is om te testen of MiMyc het gebruik van CFA als adjuvant ter inductie van EAE in resus makaken kan vervangen. Om dit doel te bereiken dient een EAE incidentie van ten minste 80% bereikt te worden, een lagere EAE incidentie leidt tot een sterke toename van de groepsgroottes die nodig zijn voor vergelijkend onderzoek met als gevolg een onbruikbaar diermodel.

Het project zal bestaan uit één EAE studie. Leidend bij de experimentele opzet is dat in geen van de experimenten CFA gebruikt zal worden om het veroorzaakte ongerief tot een minimum te beperken. De **primaire uitkomst parameter** is EAE incidentie. Voor het experiment zullen 10 dieren geïmmuniseerd worden met recombinant humaan (rh) MOG in MiMyc. Wanneer er in dit experiment geen EAE incidentie van minimaal 80% bereikt wordt, dan is MiMyc in deze dosering niet geschikt als vervanging voor CFA.

In de studie zullen klinische scores, de pathologie in het CZS, immuunresponsen in bloed en lymfoïde organen, alsmede adjuvant-gerelateerde bijwerkingen gemeten worden.

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

Het project is gericht op het verkrijgen van een betrouwbaar antwoord op de vraag of immunisatie met auto-antigeen in MiMyc kan leiden tot vervanging van CFA als adjuvant in het resus makaak EAE model. Leidend bij het opstellen van de onderzoeksstrategie zijn 1) het vermijden van CFA (in een eventuele positieve controlegroep), en 2) de inzet van het minimale aantal dieren, geweest.



Om EAE te induceren worden de dieren intracutaan, dorsaal op 10 plekken geïmmuniseerd met autoantigeen in adjuvant. De immunisatie kan evt. gevolgd worden door maximaal 3 maandelijke booster immunisaties tot er neurologische symptomen optreden, waarbij een maximale EAE score van 2 gehanteerd wordt. Scores hierboven, of een tijdsduur langer dan 3 dagen met een score van 2, zullen leiden tot een humaan eindpunt. De dieren zullen dagelijks worden geobserveerd op klinische symptomen behorend tot EAE en op mogelijke ontwikkeling van adjuvant-gerelateerde bijwerkingen. Tijdens de dierproef zal er regelmatig bloed worden afgenomen. Aan het eind van de studie of wanneer het humane eindpunt is bereikt, worden de dieren geëuthanaseerd waarna het CZS wordt onderzocht op pathologie en de immuunresponses in de lymfoïde organen worden geanalyseerd.

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

Dit project bestaat uit één *proof-of-principle* EAE studie. Leidend bij de experimentele opzet is dat daarbij geen CFA gebruikt zal worden om het veroorzaakte ongerief tot een minimum te beperken. De **primaire uitkomst parameter** is EAE incidentie. In dit experiment zullen 10 dieren geïmmuniseerd worden met recombinant humaan (rh) MOG in MiMyc. Wanneer er in dit experiment geen EAE incidentie van minimaal 80% bereikt wordt, dan is MiMyc in deze dosering niet geschikt als vervanging voor CFA.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 10.2.g
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 1          | Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het uiteindelijke doel van dit project is om te testen of MiMyc het gebruik van CFA als adjuvant ter inductie van EAE in resus makaken kan vervangen. Om dit doel te bereiken dient een EAE incidentie van ten minste 80% bereikt te worden, een lagere EAE incidentie leidt tot een sterke toename van de groepsgroottes die nodig zijn voor vergelijkend onderzoek en therapie evaluaties met als gevolg een onbruikbaar diermodel.

Het project zal bestaan uit één EAE studie. De **primaire uitkomst parameter** daarbij is EAE incidentie. **Secundaire uitkomstparameters** zijn optredende perifere T en B cel responsen. Tevens wordt de tijd tot het humane eindpunt gescoord (zie EAE score tabellen in paragraaf J). De dieren worden aan het eind van de studie, of wanneer het humane eindpunt bereikt is, geëuthanaseerd. Post mortem wordt dan de ernst van de pathologie in de hersenen en het ruggenmerg geanalyseerd, en in het bloed en de lymfoïde organen wordt de activatie van het immuunsysteem verder onderzocht.

*Het uiteindelijk doel dat wij nastreven is om m.b.v. MiMyc een robuust, bijwerkingsvrij of bijwerkingsarm, EAE inductie protocol (incidentie van minimaal 80%) op te zetten en daarmee CFA overbodig te maken. Leidend bij de experimentele opzet is dat in geen van de experimenten CFA gebruikt zal worden, ook niet als positieve controle om zo het veroorzaakte ongerief tot een minimum te beperken.*

Het meest frequent gebruikte antigeen voor EAE studies in de resus makaak is myeline oligodendrocyte glycoproteïne (MOG). Dit wordt als recombinant humaan eiwit (rhMOG) of als peptide (pMOG) geformuleerd in verschillende adjuvantia, met verschillende EAE incidenties tot gevolg. In de voorgestelde studie is MOG ook het autoantigeen van keuze.



*Referenties:*

1. Haanstra, K.G. et al. (2013) Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis with recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein in incomplete Freund's adjuvant in three non-human primate species. *J Neuroimmune Pharmacol* 8 (5), 1251-64.
2. Dunham, J. et al. (2017) Severe oxidative stress in an acute inflammatory demyelinating model in the rhesus monkey. *PLoS One* 12 (11), e0188013.
3. Haanstra, K.G. et al. (2013) Antagonizing the alpha4beta1 integrin, but not alpha4beta7, inhibits leukocytic infiltration of the central nervous system in rhesus monkey experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 190 (5), 1961-73.
4. Haanstra, K.G. et al. (2015) Selective blockade of CD28-mediated T cell costimulation protects rhesus monkeys against acute fatal experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 194 (4), 1454-66.
5. Kerlero de Rosbo, N. et al. (2000) Rhesus monkeys are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein: characterisation of immunodominant T- and B-cell epitopes. *J Neuroimmunol* 110 (1-2), 83-96.
6. Brok, H.P. et al. (2007) The human CMV-UL86 peptide 981-1003 shares a crossreactive T-cell epitope with the encephalitogenic MOG peptide 34-56, but lacks the capacity to induce EAE in rhesus monkeys. *J Neuroimmunol* 182 (1-2), 135-52.
7. Haanstra, K.G. et al. (2013) Induction of encephalitis in rhesus monkeys infused with lymphocryptovirus-infected B-cells presenting MOG34-56 peptide. *PLoS ONE* 8 (8), e71549.

10.2.e

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

- Voordat de dieren geïmmuniseerd worden zal er bloed worden afgenomen voor de bepaling van individuele nul waarden van relevante parameters en indien nodig voor het maken van getransformeerde B-cellen (deze kunnen later dienen als antigeen presenterende cellen in eventuele cellulaire *in vitro* assays). Na immunisatie zal wekelijks bloed worden afgenomen voor het bepalen van relevante immuun parameters (B en T cel responsen). Veranderingen in deze parameters zijn belangrijk om de effectiviteit van MiMyc als adjuvant te kunnen inschatten alsmede om de effecten van booster injecties te bestuderen; wekelijkse meetpunten geven een afdoende resolutie daarvoor. De maximaal toelaatbare bloed volumes worden hierbij in acht genomen.
- De huidige methode om EAE te induceren maakt gebruik van intracutane injecties op de rug met een emulsie, bevattende recombinant humaan myeline oligodendrocyte glycoproteïne (rhMOG) of een MOG peptide (34-56, pMOG) in adjuvant. Indien nodig, wordt deze handeling maandelijks herhaald (met een maximum van vier immunisaties totaal), totdat een dier EAE score 2 heeft ontwikkeld of het einde van de studie is bereikt (maximaal ongeveer 120 dagen).
- Voor wekelijkse bloedafname en gelijktijdige lichaamsgewicht meting worden de dieren gesedeerd, tevens worden dan de inoculatie plaatsen op adjuvant-gerelateerde bijwerkingen gescoord en m.b.v. niet-invasieve infrarood technologie geanalyseerd op onderhuidse ontstekingsactiviteit.
- De klinische score behorend bij EAE wordt dagelijks gemonitord. Daarbij wordt een standaard score systeem gehanteerd waarmee de gradatie van neurologische defecten wordt vastgelegd.

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

Het uiteindelijke doel van het project is om te testen of MiMyc het gebruik van CFA als adjuvant ter inductie van EAE in resus makaken kan vervangen. Om dit doel te bereiken dient een EAE incidentie van ten minste 80% bereikt te worden, een lagere EAE incidentie leidt tot een sterke toename van de groepsgroottes die nodig zijn voor vergelijkend onderzoek met als gevolg een onbruikbaar diermodel.

Gezien het feit dat de utiliteitsvraag leidend is (doel is een EAE incidentie van minstens 80%), maakt dat de inclusie van controlegroepen overbodig. Er kan dan volstaan worden met één groep dieren die geïmmuniseerd wordt met rhMOG in MiMyc; de 95% betrouwbaarheidsintervallen (CI) geven dan een indicatie van de spreiding van eventuele resultaten bij verschillende groepsgroottes (Tabel 1). *Leidend zou dan zijn dat het 95% CI in ieder geval de 80% moet omsluiten, en dat er een groepsgrootte gekozen wordt*



op basis van een minimaal aantal dieren en toch een beperkte CI, om niet te veel resolutie verliezen. Een groepsgrootte van 10 dieren voldoet het best aan die criteria. Daarbij ook in het achterhoofd houdend dat - indien dit experiment succesvol is- met toekomstige EAE experimenten, waarbij rhMOG in MiMyc als positieve controle gebruikt zou worden, de groepsgrootte 'vanzelf' zal toenemen.

# dieren/ groep (n)	EAE inc. en 95% CI	EAE inc. en 95% CI	EAE inc. en 95% CI	EAE inc. en 95% CI	EAE inc. en 95% CI
6	2/6 (10-70%)	3/6 (19-81%)	4/6 (30-90%)	5/6 (44-97%)	6/6 (61-100%)
7	3/7 (16-75%)	4/7 (25-84%)	5/7 (36-92%)	6/7 (49-97%)	7/7 (65-100%)
8	4/8 (22-79%)	5/8 (31-86%)	6/8 (41-93%)	7/8 (53-98%)	8/8 (68-100%)
9	5/9 (27-81%)	6/9 (35-88%)	7/9 (45-94%)	8/9 (57-98%)	9/9 (70-100%)
10	6/10 (31-83%)	7/10 (40-89%)	8/10 (49-94%)	9/10 (60-98%)	10/10 (72-100%)
11	7/11 (35-85%)	8/11 (43-90%)	9/11 (52-95%)	10/11 (62-98%)	11/11 (74-100%)
12	8/12 (39-86%)	9/12 (47-91%)	10/12 (55-95%)	11/12 (65-99%)	12/12 (76-100%)
13	9/13 (42-87%)	10/13 (50-92%)	11/13 (58-96%)	12/13 (67-99%)	13/13 (77-100%)
14	10/14 (45-88%)	11/14 (52-92%)	12/14 (60-96%)	13/14 (69-99%)	14/14 (79-100%)
15	11/15 (48-89%)	12/15 (55-93%)	13/15 (62-96%)	14/15 (70-99%)	15/15 (80-100%)

**Tabel 1.** Het verband tussen groepsgrootte, EAE incidentie (bereiken van klinische score 2, zie Tabel 2) en spreiding van de resultaten (als 95% confidence interval (CI)).

## B. De dieren

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

**Resus makaak (*Macaca mulatta*), n=10 volwassen, M/V.**

Diersoort: Resus makaken (*Macaca mulatta*) zijn niet-menselijke primaten die zeer geschikt zijn voor translationeel onderzoek naar acuut verloopende ontstekingsreacties van het brein zoals de acute fasen van MS; er kunnen nieuwe therapieën in worden getest maar ze kunnen ook worden gebruikt om het ziekteverloop, de pathologie of de rol van virussen hierin (met name van virussen die slechts primaten infecteren) te onderzoeken.

Herkomst: De dieren zullen afkomstig zijn van de eigen fok binnen het instituut waar het experiment wordt uitgevoerd of in uitzonderingsgevallen van een erkende leverancier, waarbij de richtlijnen van de EU zullen worden gevolgd.

Levensstadia: De dieren moeten volwassen zijn, zodat ze een goed ontwikkeld immuunsysteem en centraal zenuwstelsel hebben.

Aantal: **Er wordt 1 studie gedaan op deze bijlage. Dit experiment bestaat uit één groep van 10 dieren.**

Geslacht: Er is geen verschil aangetoond tussen de sexen in het EAE model. Afhankelijk van de vraagstelling en beschikbaarheid zal er worden gekozen voor een of beide geslachten.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Gezien de lange levensduur van resus makaken is het mogelijk dat dieren die zullen worden gebruikt in de dierproeven, gebruikt zijn in eerdere dierproeven. Indien sprake is van hergebruik, zal deze plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1<sup>e</sup> van de Wet op de Dierproeven en zoals beschreven in de Toelichting. Geselecteerde dieren mogen niet behandeld zijn met een product dat kan interfereren met het EAE model.

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

X Nee

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



#### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

##### Vervanging:

MiMyc is uitgebreid *in vitro* en *in vivo* (in de resus makaak) getest op zowel bijwerkingen als op adjuvant werking. De voorgestelde experimenten zijn *proof-of-principle* studies om te testen of MiMyc CFA als adjuvant kan vervangen in het resus makaak EAE model.

Helaas is het nog niet mogelijk om op een proefdier vrije manier auto-immuunziekten na te kunnen bootsen. In het geval van ontstekingen van het brein (zoals bij EAE en MS) wordt dit veroorzaakt door complexe interacties tussen het brein en het gehele afweersysteem en zeer waarschijnlijk ook door omgevingsinvloeden en levensstijlen. Bestaande proefdier vrije alternatieven kunnen deze interacties –nog– niet nabootsen.

Ook testen in andere diersoorten bieden hier geen uitkomst of extra informatie. Wanneer we zouden besluiten om MiMyc eerst in knaagdiermodellen voor EAE te testen, dan zou –onafhankelijk van de uitkomst van deze proeven– het traject om te testen of MiMyc ook in resus makaken CFA kan vervangen er exact hetzelfde uit zien. *De facto* zou dit dus alleen maar extra dieren kosten.

##### Vermindering:

Dit is een *proof-of-principle* studie. Een statistische benadering om tot een wetenschappelijk onderbouwde toets m.b.t. het evt. gebruik van MiMyc te komen is ondergeschikt gemaakt aan het utilitair belang. In plaats daarvan is geanalyseerd hoe de spreiding in de resultaten zich verhoudt tot het aantal ingezette dieren (Tabel 1), om zo met een redelijke mate van betrouwbaarheid vast te kunnen stellen of een 80% EAE incidentie bereikt wordt. Deze analyse leidt tot een groepsgrootte van 10 dieren.

##### Verfijning:

Eén van de belangrijkste doelen van dit voorstel is verfijning. Door het veranderen van het EAE inductie-protocol, verwachten we dat makaken minder granuloma's ontwikkelen op de immunisatie plekken.

Alle dieren worden getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.

Tijdens de experimenten wordt onnodig ongerief vermeden door het gebruik van sedatie/pijnstilling. We werken met een cumulatieve discomfort schaal (zie paragraaf J) en dieren zullen worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.

Als een dier door omstandigheden (zoals het bereiken van het humane eindpunt van een kooigenoot) gedurende de studie individueel komt te zitten, wordt er geen nieuwe partner geïntroduceerd omdat dit meer stress oplevert dan individuele huisvesting voor de resterende tijd van een studie.

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

Training: De dieren worden voor aanvang van de studie getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken, waardoor de stress kan worden verminderd.

Welzijn: Tijdens de studie zullen de dieren **als duo gehuisvest worden** en dagelijks worden geobserveerd door gekwalificeerde en competente diervverzorgers. Mochten er veranderingen optreden in gedrag, eetlust of ontlasting, dan zal de surveillance frequentie verhoogd worden en wordt de veterinaire hiervan op de hoogte gesteld waarmee indien nodig een behandelplan zal worden opgesteld (zoals bv. aanbieden van andere voeding). Mocht het dier neurologische verschijnselen ontwikkelen of een afname van het gezichtsvermogen dan zal de observatie geïntensiveerd worden; mocht daar aanleiding toe zijn, dan zal het betreffende dier uit studie genomen worden.

Medicatie: Pijn en lijden kunnen worden waargenomen. In een dergelijk geval zal in overleg met de dierenartsen worden besloten of er adequate pijnbestrijding kan en moet worden voorgeschreven. De medicatie die kan worden toegediend is afhankelijk van het experiment. In de meeste gevallen mag de



pijnmedicatie geen anti-ontstekingsmiddelen bevatten omdat deze mogelijk interfereren met de vraagstelling.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Niet van toepassing

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

In MS patiënten wordt soms pijnlijke spasticiteit waargenomen. Dit is tot nu toe niet gezien in EAE studies, maar kan niet voor de volle 100% worden uitgesloten. Wanneer symptomen van pijn worden geobserveerd zal orale of parenterale pijnstilling worden toegediend na overleg met de veterinaire. De medicatie die kan worden toegediend is afhankelijk van het experiment. In de meeste gevallen mag de pijnmedicatie geen ontstekingsremmende middelen bevatten

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?



1. ongerief door toediening van een injectie/bijwerking adjuvant
2. ongerief door sedatie en ontwaken uit sedatie
3. ongerief door klinische symptomen EAE
4. evt. single huisvesting

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. De inspuiting van een kleine hoeveelheid inoculum voor immunisatie kan ontsteking en irritatie geven. Wij verwachten –gezien het uitgebreide voorwerk dat is verricht met Mimyc- dat er zich geen granuloma's zullen vormen. Wij kunnen dit echter niet helemaal uitsluiten. Immunisatie met MiMyc is getest in combinatie met virale antigenen, en nog nooit met auto-antigenen zoals MOG.
2. Bijkomen uit een sedatie kan een gevoel van desoriëntatie en/of misselijkheid met zich meebrengen.
3. EAE leidt tot symptomen als ataxie, blindheid, paresis en paralyse. Het verlies van neurologische functies kan als stressvol worden ervaren.
4. Dieren worden normaliter in duo's gehuisvest omdat het sociale dieren zijn. Alleen gehuisvest zitten kan stress geven. Wanneer een kooimaatje vanwege de ernst van de EAE uit de studie dient te worden genomen, is single huisvesting echter onontkoombaar.

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

1. Alle dieren worden getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.
2. Voor sedatie moet het dier nuchter blijven. Daarnaast worden alle dieren extra in de gaten gehouden na het ontwaken en wanneer nodig zal de veterinar worden geraadpleegd.
3. We werken met een cumulatieve discomfort schaal (zie paragraaf J). Dieren worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.
4. Als een dier door omstandigheden (zoals het bereiken van humaan eindpunt van een kooigenoot) gedurende de studie individueel komt te zitten, wordt er geen nieuwe partner geïntroduceerd omdat dit meer stress oplevert dan individuele huisvesting voor de resterende tijd van een studie.

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dieren worden geëuthanaseerd, gevolgd door uitgebreide sectie, wanneer het eindpunt volgens de tabellen is bereikt, of als het maximaal aantal vooraf geplande dagen is bereikt, of wanneer het algemeen welzijn door andere omstandigheden ernstig wordt aangetast. De maximale duratie in de tabellen is cumulatief. De humane eindpunten voorkomen dat matig ongerief ernstig wordt en daarom is er geen sprake van ernstig ongerief in deze dierproef. Door hanteren van deze eindpunten worden de dieren uit studie genomen in een fase waarin de dieren nog steeds zelfredzaam zijn en waarin zelfstandig eten en drinken en het aangaan van sociale interacties in voldoende mate mogelijk blijven.

EAE score	Klinische symptomen	Maximale cumulatieve tijdsduur
0	Asymptomatisch	Einde experiment
0.5	Verminderd alert, veranderd loopgedrag zonder ataxie, Verminderde eetlust, braken	Einde experiment
1	Apathisch (verminderde reactie op externe prikkel)	Einde experiment
2	Ataxie (= evenwichtsstoornis), afname gezichtsvermogen	Maximaal 3 dagen
2.5	Parese (incomplete verlamming) van 1 of meer ledematen	24 uur



3.0	Paralyse (complete verlamming) van 1 (hemiplegie) of meerdere ledematen (paraplegie)	24 uur
4.0	Complete verlamming van 4 ledematen (quadriplegie)	<12 uur
5.0	Lethargie (geen reactie op externe prikkel) Niet zelfstandig kunnen eten en drinken, Onbehandelbare pijn	<2 uur

**Tabel 2. Cumulatieve EAE scoringstabel voor resus makaken.**

Dieren worden dagelijks gemonitord voor symptomen. Vanaf score 1 wordt dit meerdere keren per dag gedaan. Wanneer een score bereikt wordt hoger dan score 2, dan zal euthanasie zo snel mogelijk plaats vinden, **het is daarmee onwaarschijnlijk -maar niet volledig uit te sluiten- dat scores kortstondig boven de 2 uit zouden komen (b.v. door zeer snelle ziekte progressie).**

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

Tussen de 80 en 100%.

### K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief wordt geclassificeerd als 'matig'. Het ongerief wordt bepaald door herhaalde bloedafnames, herhaalde injecties en het ontwikkelen van EAE symptomen, waarbij een maximale EAE score van 2 gehanteerd wordt. Scores hierboven (zoals die mogelijkwijs alleen maar op zouden kunnen treden door een onverwachts snelle ziekteprogressie en die daarmee direct tot euthanasie zouden leiden), of een tijdsduur langer dan 3 dagen met een score van 2, zullen leiden tot een humaan eindpunt. De kans op ontwikkeling van verlammingverschijnselen is hiermee zeer klein. Indien er geen EAE symptomen optreden, bijvoorbeeld omdat de nieuwe inductie-methode niet het gewenste resultaat oplevert, blijft het ongerief matig als gevolg van de herhaalde bloedafnames en injecties.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

**Alle dieren worden gedood aan het einde van het experiment.** Ten einde onderzoek te kunnen doen naar de pathologie in het CZS en de immuunresponsen in de lymfoïde organen is het noodzakelijk de dieren te euthanaseren. Ook wanneer de dieren geen neurologische verschijnselen ontwikkeld hebben, is het mogelijk dat er subklinisch wel neuroinflammatie aantoonbaar is. Deze informatie is erg belangrijk en alleen te verkrijgen na necropsie en neuropathologische analyse.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



24

10.2.e  
Van: [redacted]  
Aan: [redacted]  
Onderwerp: RE: 2e controle 10.2.g  
Datum: dinsdag 16 juni 2020 17:45:29

---

Gedaan. Niks op aan te merken.  
Ik zou 11.1 [redacted], aangezien 11.1 [redacted].

Van: 10.2.e [redacted]  
Verzonden: maandag 15 juni 2020 10:45  
Aan: 10.2.e [redacted]  
Onderwerp: 2e controle 9464

23

Hoi,  
Wil je deze tweede controle doen?  
<T:\RVO\Kluis OBDA\3. CCD\3.2. Bestuursstukken\Conceptadviezen en andere brieven\10.2.e \AVC\10.2.g>  
Alvast bedankt  
Groeten 10.2.e [redacted]



**Van:** [Info-zbo](mailto:Info-zbo)  
**Aan:** "info@zbo-ccd.nl"; 10.2.g  
**Cc:** 10.2.g  
**Onderwerp:** Looptijd AVC 10.2.g  
**Datum:** vrijdag 26 juni 2020 12:57:21

---

Geachte aanvrager,

Op 03-03-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" met aanvraagnummer AVD<sup>10.2.g</sup>.

#### **Looptijd vergunning**

Uw aanvraag wordt vandaag in de CCD vergadering besproken. Als de commissie besluit voor het project een vergunning af te geven, dan kan het zijn dat uw onderzoek niet per direct kan beginnen gezien de huidige situatie rondom het coronavirus. Dit kan betekenen dat u aan het eind van de looptijd van de vergunning (maximaal 5 jaar) mogelijk te weinig tijd overhoudt om uw onderzoek af te ronden. Hoewel de CCD zich ervan bewust is dat het moeilijk is in te schatten wanneer uw onderzoek weer doorgang zou kunnen vinden, wil de CCD u nu in de gelegenheid stellen om de gewenste looptijd van uw vergunning aan te passen. Indien u hiervan gebruik wenst te maken, willen wij u vragen om ons laten weten wat de gewenste looptijd voor uw vergunning is.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.





# Advies aan CCD

Datum 29 juni 2020

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD10.2.g

Instelling: 10.2.g  
Onderzoeker: 10.2.e  
Project: Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie  
Aanvraagnummer: AVD10.2.g  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
Translationeel of toegepast onderzoek

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

<b>Proces</b>	Er is geen aanvullende correspondentie geweest met de aanvrager of de DEC.			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.4.1 Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie</b>				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		10	<b>Niet menselijke primaten</b>

### Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie

Rhesusapen (Macaca mulatta) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

### Keuze diermodel/diersoort CITATEN

"MS is een aandoening die veroorzaakt worden door complexe interacties tussen het CZS en het gehele afweersysteem. De meeste geneesmiddelen grijpen ook in op deze interacties. Met de huidige stand van proefdiervrije alternatieven is het helaas -nog- niet mogelijk om buiten het levende dier kennis te vergaren over deze interacties of om het effect van geneesmiddelen te bestuderen. Wanneer mogelijk zullen altijd proefdiervrije alternatieven ingezet worden en zullen kandidaat-geneesmiddelen bv. eerst of alleen in knaagdieren getest worden. Er zijn echter situaties waarin niet-humane primaten (NHP) ingezet moeten worden. Het pathologisch proces dat



onderzocht wordt of waarop de therapie aangrijpt, kan bv. in knaagdieren biologisch verschillend zijn van primaten of zelfs compleet afwezig zijn. Ook is het met de huidige technologieën mogelijk om geneesmiddelen steeds specifiek voor de mens te ontwerpen, waardoor ze in knaagdieren hun aangrijpingspunt niet meer herkennen en vaak in apen nog wel."

"Het EAE model in de resus makaak heeft met de marmoset gemeen dat de pathologie in de hersenen plaats vindt en dat deze in bepaalde aspecten gelijkend aan is aan die in MS. Het EAE model in de resus makaak wordt gebruikt als preklinisch model voor MS, waarbij het vooral bruikbaar is om de acute inflammatie fase te modelleren. Nataluzimab, een medicijn dat goedgekeurd is voor gebruik in RR-MS en de acute inflammatie fase blokkeert, blokkeert dan ook de ontwikkeling van EAE in de resus makaak [22], en nieuwe therapieën voor MS worden ook in dit model getest [23]. In de resus makaak is het ziekteverloop echter acuter en gaat het vergezeld van ernstigere pathologie in de hersenen dan in de marmoset. Naast preklinische studies die zich richten op de acute fase van MS, wordt het diermodel ook gebruikt om fundamentele vragen te beantwoorden die zich richten op de processen die bepalend zijn bij de overgang van acute naar chronische neuroinflammatie.

Zoals al genoemd wordt het EAE model in de resus makaak nog altijd geïnduceerd met behulp van CFA. Voor de inductie wordt het meest regelmatig gebruikt gemaakt van twee antigenen, recombinant humaan myeline oligodendrocyte glycoproteïne (rhMOG) [21], of een peptide daarvan, MOG34-56 [17, 18]. Er is in resus apen nog geen alternatief voor CFA. Immunisatie met rhMOG in IFA leidde b.v. tot EAE in slechts twee van de vijf resus makaken [19], en immunisatie met MOG34-56 peptide in IFA van vijf resus makaken leidde helemaal niet tot klinische effecten (niet gepubliceerd). Deze incidenties zijn te laag voor gebruik in preklinische of fundamentele studies.

Voor preklinische vraagstellingen die betrekking hebben op de chronische inflammatie fase van MS, is de marmoset het model van keuze. Voor preklinische vraagstellingen die betrekking hebben op de acute inflammatie fase van MS, hangt de keuze af van meerdere factoren. Soms is de marmoset b.v. niet geschikt omdat het medicijn niet kruisreageert met het target in marmosets of als er technische beperkingen zijn (b.v. als grote bloed of cerebrospinale vloeistof volumes nodig zijn). Ook kan het zijn dat een kortdurend model gewenst is, omdat de tijd dat een medicijn zijn werk kan doen beperkt is door vorming van neutraliserende antilichamen. Voor studies van fundamentele aard, hangt de keuze van het model af van de specifieke vraagstelling en hebben beide modellen hun eigen voor- en nadelen.



Er is aanzienlijke vraag naar het EAE model, ook in de resus makaak waar op dit moment geen alternatief beschikbaar is voor het gebruik van CFA. Ondanks dat er de afgelopen jaren vooruitgang is geboekt m.b.t. het beschikbaar komen van disease modifying therapies (DMT) voor relapsing remitting multiple sclerosis (rr-MS), is er nog geen enkele DMT voor de veel acutere vorm van MS, primary progressive MS (pp-MS). EAE in de resus makaak lijkt het meest op juist deze laatste vorm van MS."

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
<b>Maatschappij</b>	Er wordt verwacht dat het onderwerp in die mate politiek of maatschappelijk gevoelig is, dat eventuele extra communicatie uitingen nodig zijn. Gebruik van primaten

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p><b>Strategie C8 CITAAT</b> Het uiteindelijke doel van deze aanvraag is om een bruikbaar diermodel te verkrijgen voor het testen van kandidaat geneesmiddelen tegen neuro-inflammatoire ziektes als MS. EAE-inductie wordt bepaald aan de hand van een klinische score tabel die tevens dient om het humane eindpunt te bepalen. Hiermee bestaat al veel ervaring en kan er goed worden vastgesteld of een EAE-incidentie van ten minste 80% bereikt wordt. De proefopzet met herhaalde immunisaties, indien nodig, en de gekozen tijdsintervallen zijn gebaseerd op het rhMOG/IFA marmoset EAE-model en juist gekozen (AVD502002017881). De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project</p> <p><b>C9 Bijzondere Categorieën CITAAT</b> De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor het ontwikkelen van MS-gerelateerde symptomen na immunisatie met recombinant humaan MOG (rhMOG) in Compleet Freund's adjuvant (CFA). Bovendien vertoont deze diersoort zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens en is daarom eerder ingezet als diermodel voor het testen van kandidaat geneesmiddelen tegen MS. Dit diermodel is nodig voor een goede translatie naar de mens en kan met name voor therapieën die gericht zijn op het beïnvloeden van het immuunsysteem en specifiek zijn ontwikkeld voor gebruik in de mens niet vervangen worden door andere diermodellen. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: CITAAT</p>
-------------------	---



1. Rechtvaardigt het testen van een nieuw mild adjuvant (MiMyc) voor geschiktheid om EAE te induceren in resusapen het ongerief dat de dieren wordt aangedaan en de aantasting van hun integriteit? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren, andere onderzoekmodellen of patiënten.

2. Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Het betreft dieren waarbij EAE wordt geïnduceerd, door immunisatie met het antigeen rhMOG in combinatie met het adjuvant MiMyc. De welzijnsaantasting kan resulteren in neurologische verschijnselen zoals verlamming en evenwicht/zicht problemen en de dieren kunnen pijn ondervinden. Ongerief en lijden zal zo veel mogelijk worden beperkt. Daarmee resulteert dit in maximaal matig ongerief voor de dieren. Anderzijds zal het beschikbaar komen van een mild adjuvant voor de inductie van EAE in resusapen wereldwijd dit model kunnen verfijnen. Een toekomstige opbrengst kan betekenis hebben voor auto-immuun ziektes in andere diermodellen waar het gebruik van CFA in deze modellen overbodig zou kunnen worden en daarmee belangrijk bijdragen aan vermindering van ongerief bij dit type experimenten.

De waarde voor de samenleving is er vooral in gelegen dat voor het onderzoek en de ontwikkeling van betere medicijnen tegen neuro-inflammatoire ziektes, zoals MS, een diermodel verkregen wordt waarbij het ongerief voor de dieren sterk gereduceerd is ten opzichte van de huidige diermodellen. Dit verfijnde diermodel kan wereldwijd worden ingezet om nieuwe kandidaat geneesmiddelen tegen MS te testen om zodoende de behandeling van mensen met MS te verbeteren en daarmee ernstige chronische ziekte met sociaal-economische schade en patiëntenleed te voorkomen. Dit onderzoek is daarmee van aanmerkelijk belang in het kader van verfijning en voor toekomstige ontwikkeling voor betere medicijnen tegen MS.

De waarde voor het onderzoeksveld is toenemend wetenschappelijk inzicht in de inductie mechanismen van EAE. Voor het onderzoeksveld is van belang dat niet-humane primaten goed modelleren voor het immuunsysteem bij de mens waardoor de resultaten uit dit onderzoek goed te extrapoleren zijn naar de mens.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van een EAE-model in resusapen waarbij ernstig ongerief ten gevolge van het gebruik van CFA vermeden wordt.

3. De DEC concludeert dat de belangen/waarden van de samenleving alsmede de proefdieren die in EAE en mogelijk andere auto-immuun



ziekte modellen zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.

Het gebruik van apen is nog steeds nodig voor onderzoek naar en ontwikkeling van betere medicijnen tegen neuro-inflammatoire aandoeningen, zoals MS, evenals andere auto-immuun ziektes. De complexe interactie tussen afweersysteem en lichaamseigen componenten en de condities waaronder dit leidt tot ziekte kunnen niet afdoende in vitro bestudeerd worden. Alhoewel kandidaat geneesmiddelen doorgaans eerst in knaagdiermodellen getest worden is het uiteindelijk voor de mens ontworpen medicijn vaak dermate specifiek dat het in knaagdieren niet werkt en in een aantal gevallen ook in de marmoset niet getest kan worden. Het EAE model in resusapen is daarom onontbeerlijk om dergelijk specifieke middelen te testen. Helaas is tot op heden CFA nodig voor de ziekte inductie, hetgeen gepaard gaat met ernstig ongerief. Zowel vanuit het perspectief van maatschappelijke verantwoordelijkheid als om het ongerief voor de dieren die in deze studies gebruikt worden zoveel mogelijk te beperken is het ethisch te verantwoorden om de hier beschreven experimenten met het adjuvant MiMyc uit te voeren.

De expertise voor het verrichten van deze experimenten is beschikbaar binnen de instelling en bij de betrokken onderzoekers. De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek op het gebied van EAE modellen in zowel de resusaap als de marmoset. De vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten zijn binnen het instituut aanwezig.

Naar inschatting van de DEC zijn de doelstellingen van dit project haalbaar. Er is veel voorwerk gedaan aan het te testen adjuvant, zowel in in vitro als in vivo studies. Het te gebruiken ziekte inductie model is vele malen toegepast en robuust gebleken bij gebruik van CFA als adjuvant. In bepaalde fases van het onderzoek naar nieuwe medicijnen tegen MS die een hoge specificiteit hebben voor targets die alleen bij de mens en de resusaap voorkomen is het EAE-model in resusapen onontbeerlijk. Het beschikbaar komen van een mild adjuvant voor EAE-inductie is een belangrijke verfijning binnen deze experimenten. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. De 3V-principes worden gehonoreerd door hergebruik van dieren, en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen. Het ongerief is maximaal matig. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven. De dieren worden gedood aan het eind van de studie. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt.



De DEC heeft extern advies ingewonnen bij  
- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd  
CITAAT

- Gestelde vraag/vragen: Nadere onderbouwing van het belang van de studies door aanvullende informatie over de te verwachten mate van toepassing in toekomstige dierstudies. Nadere verduidelijking van de onderzoeksstrategie en het benodigd aantal dieren. Einddatum van de aanvraag (benodigde projecttijd). Enige tekstuele aanpassingen.

- Verstrekt(e) antwoord(en): De noodzaak om dit diermodel, evenals andere diermodellen voor auto-immun ziektes, ook in de toekomst toe te passen en dus het belang van het verkrijgen van een milder adjuvant voor deze diermodellen is nader toegelicht. De onderzoeksstrategie is sterk aangepast. Het verkrijgen van een geschikt EAE model in niet-humane primaten met het mildere adjuvant MiMyc in Incomplete Freund's adjuvant (IFA) is nu voorop gesteld. Er zijn 10 dieren nodig voor het bereiken van deze doelstelling. De tijdsduur van de aanvraag is aangepast van 5 naar 3 jaar.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### 3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies
----------------------

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies wordt helder vermeld welke vragen aan de aanvrager zijn gesteld. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.
---



#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>CITAAT</p> <p>Dit project richt zich op de evaluatie van een mild adjuvant om het model voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie in de resus makaak te induceren. Het doel is om in de resus makaak CFA te vervangen door een adjuvant dat minder of geen bijwerkingen geeft, maar dat wel leidt tot auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie. Dit in het kader van Verfijning.</p> <p>De noodzaak van vervanging van CFA in EAE inductie protocollen in makaken beperkt zich niet ons instituut want ook in labs in China, Japan, Frankrijk, Israël en de Verenigde Staten is dit nog steeds het standaardprotocol [40-48]. De afgelopen vijf jaar worden er gemiddeld eens per jaar resultaten van een grote studie met makaken aan het openbare domein toevertrouwd [45-48]. Studies die plaats hebben gevonden binnen contract research organizations of de farmaceutische industrie worden niet noodzakelijkerwijs allemaal gepubliceerd, en een conservatieve schatting is dat vervanging van CFA voor tussen de 40 en 100 makaken op jaarbasis een aanzienlijke verfijning zou betekenen. Resultaten van deze studie zullen middels publicatie gedeeld worden met het internationale onderzoeksveld.</p>
Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>CITAAT</p> <p>Wetenschappelijk</p> <p>Een hoog percentage kandidaat geneesmiddelen overleeft de vertaling van diermodel naar MS patiënt niet (&gt;90% voor RR-MS en 100% voor SP- en PP-MS). Een belangrijke oorzaak daarvoor is de kloof tussen de in het preklinisch onderzoek veel gebruikte EAE modellen in knaagdieren en de MS patiënt. De EAE modellen in NHP worden algemeen beschouwd als een relevante overbrugging van deze kloof. De vertaalbaarheid van resultaten verkregen in EAE modellen in knaagdieren wordt negatief beïnvloed door het feit dat alle dieren genetisch zeer nauw verwant zijn (inbred), dat de dieren specific-pathogen free (SPF) gehuisvest zijn (waardoor hun immuunsysteem anders uitrijpt dan wanneer er een normale blootstelling is aan virussen en bacterien), dat er aanmerkelijke verschillen zijn in de neuropathologie met MS, en dat er een grote genetische afstand is met de mens. EAE modellen in non-SPF, outbred NHP vertonen enerzijds grote immunologische overeenkomsten met MS, anderzijds vertonen ze ook grote neuropathologische overeenkomsten met MS. Onderzoek in NHP modellen kan bv. nieuwe inzichten verschaffen in de overgang van de relapsing-remitting naar de progressieve fase van de ziekte, waarvoor op dit moment nog geen enkele effectieve medicatie bestaat. Optimalisatie van de modellen in NHP is daarbij wel noodzakelijk. Vooral vanuit het oogpunt van dierenwelzijn, waarbij het gebruik van CFA ongerief veroorzaakt dat niet</p>



ziekte-gerelateerd is. Daarnaast is het zo, alhoewel dat niet het doel is van dit project, dat een milder adjuvant ook mogelijkheden kan bieden om het acute verloop van het rhesus EAE model te temperen, om daarmee het model ook voor andere toepassingen geschikt te maken.

#### Maatschappelijk

Het maatschappelijk belang van dit project is tweeledig en betreft zowel dier als mens.

Voor de t.b.v. de mens ingezette dieren hebben wij de maatschappelijke verantwoordelijkheid om het ongerief zo klein mogelijk te maken. Vervanging van CFA in het EAE model in de resus makaak door een milder adjuvant met minder of geen bijwerkingen zou het niet-ziekte gerelateerde ongerief voor de dieren sterk reduceren: een aanzienlijke verfijning. Daarnaast is het zo dat een succesvolle vervanging van CFA in het resus EAE model ook aanleiding zou kunnen geven voor onderzoek naar de mogelijke vervanging van CFA in modellen voor auto-immuunziektes in andere diersoorten, zoals b.v. EAE in marmosets, ratten en muizen en collageen-geïnduceerde artritis in ratten. Het is daarbij nog onduidelijk hoe goed resultaten uit de resus makaak zich laten vertalen naar andere species, en vice versa.

Voor de mens is iedere vooruitgang in de behandelingsmogelijkheden van MS een sprong voorwaarts. In Nederland treft de diagnose MS ongeveer 1 op de 1000 mensen. De jaarlijkse kosten voor de zorg en behandeling van deze 17.000 mensen liggen tussen 500 en 700 miljoen euro. De ziekte treft vooral jong-volwassenen en is, na trauma, de belangrijkste oorzaak van neurologische ziekte in jong-volwassenen. Tezamen vormt dit een aanzienlijk economisch belang.

MS heeft een enorme impact op de maatschappelijke participatie (werk/sociale contacten) en leidt tot een sterk verminderde kwaliteit van leven. Er is dringend behoefte aan een veilige en effectieve behandeling van MS. De huidige therapieën die ontwikkeld zijn tegen MS werken in een deel van de RR-MS patiënten, maar zijn helaas niet werkzaam in patiënten met SP-MS of PP-MS. Tevens hebben de huidige therapieën veel bijwerkingen zoals terugkerende infecties die langdurig gebruik in de weg staan. Omdat de ziekte een ernstig verloop heeft met blijvende invaliditeit is het zeer belangrijk dat de ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen MS blijft doorgaan.

Onderbouwing  
wetenschappelijk en  
maatschappelijk belang

Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang zijn 11.1



<p><b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>De DEC zegt hierover het volgende:</p> <p>De onderzoeksgroep heeft een ruime ervaring met het onderzoek aan EAE in niet-humane primaten en het instituut heeft veel ervaring met het werken met niet-humane primaten.</p> <p>Het Secretariaat heeft 11.1 .</p>
---	---

**3V's**

<p>Vervanging</p>	
	<p><b>3.4.4.1 Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie:</b> CITAAT</p> <p>MiMyc is uitgebreid in vitro en in vivo (in de resus makaak) getest op zowel bijwerkingen als op adjuvant werking. De voorgestelde experimenten zijn proof-of-principle studies om te testen of MiMyc CFA als adjuvant kan vervangen in het resus makaak EAE model. Helaas is het nog niet mogelijk om op een proefdier vrije manier auto-immuunziektes na te kunnen bootsen. In het geval van ontstekingen van het brein (zoals bij EAE en MS) wordt dit veroorzaakt door complexe interacties tussen het brein en het gehele afweersysteem en zeer waarschijnlijk ook door omgevingsinvloeden en levensstijlen. Bestaande proefdier vrije alternatieven kunnen deze interacties –nog- niet nabootsen.</p> <p>Ook testen in andere diersoorten bieden hier geen uitkomst of extra informatie. Wanneer we zouden besluiten om MiMyc eerst in knaagdiermodellen voor EAE te testen, dan zou -onafhankelijk van de uitkomst van deze proeven- het traject om te testen of MiMyc ook in resus makaken CFA kan vervangen er exact hetzelfde uit zien. De facto zou dit dus alleen maar extra dieren kosten.</p>
<p>Verminderen</p>	
	<p><b>3.4.4.1 Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie:</b> CITAAT</p> <p>Dit is een proof-of-principle studie. Een statistische benadering om tot een wetenschappelijk onderbouwde toets m.b.t. het evt. gebruik van MiMyc te komen is ondergeschikt gemaakt aan het utilitair belang. In plaats daarvan is geanalyseerd hoe de spreiding in de resultaten zich verhoudt tot het aantal ingezette dieren (Tabel 1), om zo met een redelijke mate van betrouwbaarheid vast te kunnen stellen of een 80% EAE incidentie bereikt wordt. Deze analyse leidt tot een groeps-grootte van 10 dieren.</p>



Verfijnen	
	<p><b>3.4.4.1 Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroïnflemmatie:</b> CITAAT</p> <p>Eén van de belangrijkste doelen van dit voorstel is verfijning. Door het veranderen van het EAE inductie-protocol, verwachten we dat makaken minder granuloma's ontwikkelen op de immunisatie plekken.</p> <p>Alle dieren worden getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegepast.</p> <p>Tijdens de experimenten wordt onnodig ongerief vermeden door het gebruik van sedatie/pijnstilling. We werken met een cumulatieve discomfort schaal (zie paragraaf J) en dieren zullen worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.</p> <p>Als een dier door omstandigheden (zoals het bereiken van humaan eindpunt van een kooigenoot) gedurende de studie individueel komt te zitten, wordt er geen nieuwe partner geïntroduceerd omdat dit meer stress oplevert dan individuele huisvesting voor de resterende tijd van een studie.</p>

<b>Hergebruik</b>	Er is sprake van hergebruik van dieren.
<p>3.4.4.1 Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroïnflemmatie: CITAAT Gezien de lange levensduur van resus makaken is het mogelijk dat dieren die zullen worden gebruikt in de dierproeven, gebruikt zijn in eerdere dierproeven. Indien sprake is van hergebruik, zal deze plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1e van de Wet op de Dierproeven en zoals beschreven in de Toelichting. Geselecteerde dieren mogen niet behandeld zijn met een product dat kan interfereren met het EAE model.</p>	

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroïnflemmatie	Ja	volgens de richtlijn.



Naam proef		
<b>3.4.4.1 Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie</b>	HEP: CITAAT Tussen de 80 en 100%	CITAAT Dieren worden geëthanaseerd, gevolgd door uitgebreide sectie, wanneer het eindpunt volgens de tabellen is bereikt, of als het maximaal aantal vooraf geplande dagen is bereikt, of wanneer het algemeen welzijn door andere omstandigheden ernstig wordt aangetast. De maximale duratie in de tabellen is cumulatief. De humane eindpunten voorkomen dat matig ongerief ernstig wordt en daarom is er geen sprake van ernstig ongerief in deze dierproef. Door hanteren van deze eindpunten worden de dieren uit studie genomen in een fase waarin de dieren nog steeds zelfredzaam zijn en waarin zelfstandig eten en drinken en het aangaan van sociale interacties in voldoende mate mogelijk blijven.  <<zie bijlage 3.4.4.1 sectie J voor tabel 2>> Tabel 2. Cumulatieve EAE scoringstabel voor resus makaken.  Dieren worden dagelijks gemonitord voor symptomen. Vanaf score 1 wordt dit meerdere keren per dag gedaan. Wanneer een score bereikt wordt hoger dan score 2, dan zal euthanasie zo snel mogelijk plaats vinden, het is daarmee onwaarschijnlijk -maar niet volledig uit te sluiten- dat scores kortstondig boven de 2 uit zouden komen (b.v. door zeer snelle ziekte progressie.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	

## 5 Samenvatting

Het projectvoorstel bevat 11.1 over het belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's, het ongerief en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen. Het DEC advies kan ten grondslag liggen van het besluit.

Het doel van dit project is om te testen of MiMyc het gebruik van CFA als adjuvant ter inductie van EAE in resus makaken kan vervangen. Als de proof of principle wordt aangetoond dan zal dit een verfijning betekenen voor resus makaken gebruikt pre-klinische in studies voor MS. De beoogde verfijning is dat MiMyc bijwerkingsvrij of bijwerkingsarm is voor de dieren in tegenstelling tot CFA.



De keuze voor de diersoort, resus makaken, is voor de DEC en het Secretariaat voldoende onderbouwd. Omdat primaten ingezet worden in dit project is een beoordeling achteraf noodzakelijk.

De aanvrager geeft aan dat gezien de lange levensduur van resus makaken het mogelijk is dat dieren die zullen worden gebruikt in dit project, gebruikt zijn in eerdere dierproeven. Er is dus (voor een deel van de dieren) sprake van hergebruik. Voor de DEC en het Secretariaat is dit 11.1 [REDACTED]

#### **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

Het Secretariaat 11.1 [REDACTED]

Het Secretariaat adviseert 11.1 [REDACTED]

Voorstel is om 11.1 [REDACTED]

Hierbij stelt het Secretariaat voor de volgende voorwaarden te stellen:

#### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

#### **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



**Van:** Info-zbo  
**Aan:** 10.2.e ; Info-zbo  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g  
**Datum:** dinsdag 30 juni 2020 14:27:51  
**Bijlagen:** image001.png

33

Beste 10.2.e

Dank voor het toesturen. Het is in goede orde ontvangen.

Groeten 10.2.e

**Van:** 10.2.e

**Verzonden:** dinsdag 30 juni 2020 14:16

32

**Aan:** Info-zbo

**Onderwerp:** Re: Aanhouden AVD 10.2.g

Geachte CCD,

Bij deze in bijlage de, naar aanleiding van de opmerkingen door de CCD, aangepaste NTS van aanvraag AVD 10.2.g (modificaties gemarkeerd in rood). Zou u ontvangst in goede orde kunnen bevestigen? Ik heb gezocht naar de optie om dit via NetFTP te doen, maar kan geen link vinden.

Met vriendelijke groet / Kind regards,

10.2.e

P.O. Box 10.2.g The Netherlands

10.2.e [www.10.2.g](http://www.10.2.g)

**Van:** Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>

**Datum:** maandag 29 juni 2020 om 13:27

**Aan:** "10.2.e" <10.2.e>, "10.2.e" <10.2.e>

27

**Onderwerp:** Aanhouden AVD 10.2.g

Geachte 10.2.e

De CCD heeft aanvraag AVD 10.2.g afgelopen vrijdag besproken tijdens de vergadering en is voornemens hiervoor een vergunning te verlenen. Voordat de vergunning wordt toegestuurd willen wij u graag verzoeken een aanpassing in de NTS door te voeren. De CCD is van mening dat de in sectie 3.1 erg breed omschreven is en daarmee wellicht voor een algemeen publiek lastig te begrijpen is. In het projectvoorstel wordt de focus op multipele sclerose goed duidelijk. Wij adviseren u sectie 3.1. van de NTS meer toe te spitsen op multipele sclerose.

### Looptijd vergunning

Uw aanvraag wordt vandaag in de CCD vergadering besproken. Als de commissie besluit voor het project een vergunning af te geven, dan kan het zijn dat uw onderzoek niet per direct kan beginnen gezien de huidige situatie rondom het coronavirus. Dit kan betekenen dat u aan het eind van de looptijd van de vergunning (maximaal 5 jaar) mogelijk te weinig tijd overhoudt om uw onderzoek af te ronden. Hoewel de CCD zich ervan bewust is dat het moeilijk is in te schatten wanneer uw onderzoek weer doorgang zou kunnen vinden, wil de CCD u nu in de gelegenheid stellen om de gewenste looptijd van uw vergunning aan te passen. Indien u hiervan gebruik wenst te maken, willen wij u vragen om ons laten weten



wat de gewenste looptijd voor uw vergunning is.

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

**Wanneer een beslissing**

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

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

10.2.g



Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard



ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Aan:** 10.2.e  
**Cc:**  
**Onderwerp:** Aanhouden AVC10.2.g  
**Datum:** maandag 29 juni 2020 13:29:37

---

Geachte 10.2.e ,

Op 03-03-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" met aanvraagnummer AVD10.2.g .

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

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de leges hebben ontvangen.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



31

**Van:** 10.2.e  
**Aan:** [Info-zbo](mailto:info-zbo)  
**Onderwerp:** Re: Vraag AVD 10.2.g  
**Datum:** dinsdag 30 juni 2020 14:44:35  
**Bijlagen:** [image001.png](#)

---

Beste 10.2.e

Super. Dank voor de snelle reactie. Hier kan ik zeker mee uit de voeten. De betaling wordt geregeld.

Groet,

10.2.e

---

**Van:** Info-zbo

**Datum:** dinsdag 30 juni 2020 om 14:22

**Aan:** 10.2.e, "info@zbo-ccd.nl"

**Onderwerp:** RE: Vraag AVD 10.2.g

Beste 10.2.e

Hier nogmaals de factuur. Dit maal onbeveiligd. Kan je hiermee uit de voeten?

Groeten 10.2.e

---

**Van:** 10.2.e

30

**Verzonden:** dinsdag 30 juni 2020 14:16

**Aan:** info@zbo-ccd.nl

**Onderwerp:** Vraag AVD 10.2.g

Geachte heer, mevrouw

In uw mail van 29 juni jl. gaf u aan dat de leges voor aanvraag 10.2.g nog niet betaald was. Ik heb de stukken gecontroleerd en ik beseft dat dit inderdaad nog niet heeft plaatsgevonden. In de bevestigingsmail is een secore document bijgevoegd, deze kan ik niet openen.

Zou u een reguliere bevestiging /factuur voor deze aanvraag aan mij kunnen sturen (of een handleiding hoe ik deze secore file kan openen; ik ben gemandateerd vergunninghouder).

Met vriendelijke groet,

10.2.e

29



10.2.e

P.O. Box 10.2.g The Netherlands

10.2.e [www.10.2.g](http://www.10.2.g)

10.2.g

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.



De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

10.2.g







## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Het testen van een nieuw adjuvant, met minder of geen bijwerkingen, om auto-immunziektes van het brein te modelleren in resus apen
1.2 Looptijd van het project	5 jaar; start 01-04-2020 – eind 01-04-2023
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Verfijning, diermodel, ongerief, mild, auto-immuun ziektes

### 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" 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)	<p>Auto-immunziektes zijn aandoeningen waarbij het eigen lichaam het doelwit vormt van het immuunsysteem. Bekende voorbeelden van auto-immunziektes zijn diabetes type I, reumatoïde artritis, lupus en multipale sclerose (MS).</p> <p>Gezien de complexiteit van dit soort ziektes, waarbij verschillende typen immuun cellen in het bloed geactiveerd raken en vervolgens in een orgaan schade aanrichten, zijn proefdier modellen nog steeds noodzakelijk om het ziekteproces beter te begrijpen en om medicijnen en therapieën te kunnen testen. Ondanks dat er modellen voor menselijke auto-immunziektes in knaagdieren opgezet zijn, zijn deze niet voor alle doelstellingen geschikt. <b>Wanneer dit het geval is, wordt er gebruik gemaakt van beter op de mens</b></p>
---	---



gelijkende modellen in apen, zoals in resus makaken.

Eén van de meest gebruikte diermodellen voor MS is het EAE model. EAE kan opgewekt worden in knaagdieren, maar ook in apen zoals marmosets en makaken. Deze modellen lijken in immunologisch en pathologisch opzicht sterk op de mens.

Om EAE in makaken op te wekken, zijn zeer sterke hulpstoffen (*adjuvantia*) zoals bijvoorbeeld Compleet Freund's adjuvant (CFA) noodzakelijk om de tolerantie voor lichaamseigen doelwitantigeen te doorbreken. Een belangrijk nadeel van CFA is dat het gebruik ervan gepaard kan gaan met ernstige bijwerkingen, zoals onderhuidse ontstekingsreacties. Deze bijwerkingen tasten het welzijn van de dieren aan en zijn mogelijk te voorkomen.

In het kader van verfijning, hebben wij een nieuw, mild adjuvant ontworpen, MiMyc genaamd, dat geen of zeer weinig bijwerkingen geeft. Dit project richt zich op het testen van dit nieuwe adjuvant in een pre-klinisch resus makaak model voor MS. Het uiteindelijke doel is om CFA in dit model te vervangen en zo het niet-ziekte gerelateerde ongerief van de dieren te verminderen.

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

Primair doel is het verkrijgen van een nieuw, mild adjuvant om daarmee het model voor auto-immuunziekten van het brein in de resus makaak te verfijnen en het ongerief van de dieren te verminderen. De bijwerkingen die het nu nog gebruikte adjuvant (CFA) in de resus makaak veroorzaakt zijn ernstig.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

10 resus makaken.

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

Het te testen adjuvant wordt geformuleerd en, onder narcose, intracutaan op verschillende plaatsen op de rug in kleine hoeveelheid geïnjecteerd. Te verwachten negatieve gevolgen voor het proefdier zijn sufheid en misselijkheid ten gevolge van de narcose. Daarnaast zijn er de ziekteverschijnselen behorend bij het diermodel, bijvoorbeeld het verlies van neurologische functies, waar de dieren last van zullen hebben.

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

Het cumulatieve ongerief wordt ingeschat als matig.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Alle dieren worden aan het einde van het experiment geëuthanaseerd. Om onderzoek te kunnen doen naar de pathologie in het brein en de immunresponsen in de lymfoïde organen is dit noodzakelijk.

## 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

De samenstelling van het te testen adjuvant is volledig met behulp van proefdiervrije technologie (bioassays voor aangeboren immunresponsen) tot stand gekomen, en ook de eerste analyses voor het mogelijk veroorzaken van bijwerkingen zijn *in vitro* gedaan.

We weten ondertussen dat het te testen adjuvant in resus makaken 1) zeer weinig tot geen lokale bijwerkingen geeft en 2) wel immunresponsen stimuleert. We weten nog niet of deze stimulatie ook voldoende is om een auto-immuunziekte te kunnen laten ontstaan, en dat is wel nodig wil het



gebruikt kunnen worden.

adjuvant CFA kunnen vervangen. Helaas is het nog niet mogelijk om op een proefdiervrije manier auto-immuunziektes na te kunnen bootsen. In het geval van ontstekingen van het brein (zoals bij MS) wordt dit veroorzaakt door complexe interacties tussen het brein en het gehele afweersysteem en zeer waarschijnlijk ook door omgevingsinvloeden en levensstijlen. Bestaande proefdiervrije alternatieven kunnen deze interacties –nog– niet nabootsen.

#### 4.2 Vermindering

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

Dit is een *proof-of-principle* studie. Het minimum aantal dieren dat nodig is om met een redelijke mate van betrouwbaarheid vast te kunnen stellen dat een ziekte incidentie van 80% of hoger geïnduceerd wordt -het criterium ter bepaling of MiMyc een geschikte vervanging van CFA is- is 10 dieren.

#### 4.3 Verfijning

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

De belangrijkste doelstelling van dit project **is** verfijning van een diersmodel voor auto-immuunziektes van het brein in de resus makaak. De noodzaak tot vervanging van CFA is groot in de resus makaak, gezien de heftigheid van de bijwerkingen in deze diersoort. Toch wordt dit model nog met regelmaat en wereldwijd gebruikt waardoor de impact van een nieuw milder adjuvant op dierenwelzijn groot zal zijn. Resultaten van dit onderzoek zullen middels publicatie beschikbaar gemaakt worden voor de internationale onderzoeksgemeenschap.

Ontwikkeling van een bijwerkingsvrij of bijwerkingsarm, maar toch potent, adjuvant zou op termijn mogelijk ook in modellen voor auto-immuunziekten in andere diersoorten (zoals in ratten, muizen en cavia's) tot verfijning kunnen leiden alhoewel daarvoor eerst proeven in de betreffende diersoorten nodig zullen zijn.

Tijdens de experimenten wordt onnodig ongerief vermeden door het gebruik van sedatie/pijnstilling.

Bij het bereiken van een van tevoren gesteld humane eindpunt worden de dieren geëuthanaseerd.

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

Training van dieren, sedatie en/of narcose, dagelijkse observatie, euthanasie op basis van humane eindpuntcriteria.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



**Van:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**Aan:** 10.2.e  
**Cc:** [Info-zbo](mailto:Info-zbo)  
**Onderwerp:** Ondertekening AVD 10.2.g NIET akkoord  
**Datum:** donderdag 9 juli 2020 15:23:28

---

Beste 10.2.e

De beschikking van aanvraag AVD 10.2.g is NIET ondertekend.  
Het betreft een nieuwe aanvraag.

Opmerkingen m.b.t. de beschikking:  
datum start aanpassen svp!

Ferry Braunstahl Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.  
The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



**Van:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**Aan:** [Secretariaat OBDA](#)  
**Cc:** 10.2.e  
**Onderwerp:** Ondertekening AVD 10.2.g akkoord  
**Datum:** donderdag 9 juli 2020 15:33:24

---

Beste 10.2.e

De beschikking van aanvraag AVD 10.2.g is ondertekend.  
Het betreft een nieuwe aanvraag.

Opmerkingen m.b.t. de beschikking:  
datum start aanpassen svp!

Ferry Braunstahl



**Van:** Info-zbo  
**Aan:** 10.2.e  
**Cc:**  
**Bcc:**  
**Onderwerp:** Beschikking AVC10.2.g  
**Datum:** donderdag 9 juli 2020 16:25:25  
**Bijlagen:** [AVC10.2.g -ADJ-FAF dec advies 2020-05-26 Def.docx](#)  
[Beschikking AVI 10.2.g .pdf](#)

---

Geachte 10.2.e ,  
In de bijlage treft u de beschikking van uw **aanvraag AVD<sup>10.2.g</sup>** aan, waarnaar wij gemakshalve naar verwijzen.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

.....  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



Dit is een vergelijkingsdocument waarin veranderingen t.a.v. eerdere versies inzichtelijk zijn gemaakt. Dit document dient ter verduidelijking en vormt geen onderdeel van de inventarislijst.

31-8-2021 14:11:42

## Resultaten vergelijken

Oud bestand:

**BeschikkingsBriefTOE.pdf**

8 pagina's (92 KB)

15-6-2020 10:42:56

versus

Nieuw bestand:

**BeschikkingsBriefTOE\_4.pdf**

8 pagina's (154 KB)

9-7-2020 15:33:23

Totaal aantal  
veranderingen

**19**

Inhoud

4 Vervangingen  
10 Invoegingen  
5 Verwijderingen

Stijl en  
annotaties

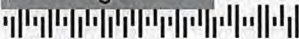
0 Stijlen  
0 Annotaties

[Naar eerste wijziging \(pagina 1\)](#)





> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g  
10.2.e  
Postbus 10.2.  
g  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD 10.2.g  
**Bijlagen**  
3

Datum 9 juli 2020  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e,

Op 3 maart 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" met aanvraagnummer AVD 10.2.g. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 10 juli 2020 tot en met 1 april 2023.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.



## Procedure

Datum:  
9 juli 2020  
Aanvraagnummer:  
AVC 10.2.g

### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC 10.2.g (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 28 mei 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 29 juni 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op een aanpassing in de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

### **Overwegingen**

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de aangevraagde startdatum reeds verstreken is.

### *Beoordeling achteraf*

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d van de wet. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2024 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag:

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.



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 vergunninghouder valt.

**Datum:**  
9 juli 2020  
**Aanvraagnummer:**  
AVD 10.2.g

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

10.2.e

drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving





# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: 10.2.g

Adres: Postbus 10.2.

Postcode en plaats: 10.2.g

Deelnemersnummer: 10.2.g

deze projectvergunning voor het tijdvak 10 juli 2020 tot en met 1 april 2023, voor het project "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" met aanvraagnummer AVD10.2.g, na advies van dierexperimentencommissie DEC 10.2.g

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Unithoofd. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is Afdelingshoofd verantwoordelijk.

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 3 maart 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 29 mei 2020;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 30 juni 2020;
  - c Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 28 mei 2020
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 30 juni 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.4.1 Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie</b>			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	10	100,0% Matig

### Voorwaarden

#### Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

#### Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.



**Aanvraagnummer:**

AVD10.2.g

- 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:**

AVD10.2.g

## 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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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 verdooving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving onvereenigbaar 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



**Aanvraagnummer:**

AVD10.2.g

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

**Einde van een dierproef**

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

Volgens artikel 13b van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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, zevende lid van de wet, die het gebruik van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

**Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die



**Aanvraagnummer:**

AVD10.2.g

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





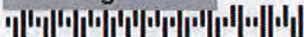
> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g

10.2.e

Postbus 10.2.

g



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVC10.2.g

**Bijlagen**

3

**Datum** 9 juli 2020

**Betreft** Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e,

Op 3 maart 2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" met aanvraagnummer AVC10.2.g. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning wordt afgegeven van 10 juli 2020 tot en met 1 april 2023.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

#### **Beoordeling achteraf**

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.



## Procedure

Datum:  
9 juli 2020  
Aanvraagnummer:  
AVD10.2.g

### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC 10.2.g (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 28 mei 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 29 juni 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op een aanpassing in de NTS. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

## Overwegingen

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

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de aangevraagde startdatum reeds verstreken is.

### *Beoordeling achteraf*

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d van de wet. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2024 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

## Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.



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 vergunninghouder valt.

**Datum:**  
9 juli 2020  
**Aanvraagnummer:**  
AVD 10.2.g

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

10.2.e



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving





# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: 10.2.g

Adres: Postbus 10.2.g

Postcode en plaats: 10.2.g

Deelnemersnummer: 10.2.g

deze projectvergunning voor het tijdvak 10 juli 2020 tot en met 1 april 2023, voor het project "Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie" met aanvraagnummer AVD10.2.g, na advies van dierexperimentencommissie DEC 10.2.g

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Unithoofd. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is Afdelingshoofd verantwoordelijk.

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 3 maart 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 29 mei 2020;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 30 juni 2020;
  - c Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 28 mei 2020
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 30 juni 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.4.1 Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie</b>			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	10	100,0% Matig

### Voorwaarden

#### Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

#### Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.



**Aanvraagnummer:**

AVD10.2.g

- 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:**

AVD10.2.g

## 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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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 onvereenigbaar 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



**Aanvraagnummer:**

AVD10.2.g

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

#### **Einde van een dierproef**

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

Volgens artikel 13b van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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, zevende lid van de wet, die het gebruik van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

#### **Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die



**Aanvraagnummer:**

AVD10.2.g

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



**Van:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**Aan:** [dec@10.2.g](mailto:dec@10.2.g)  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD10.2.g  
**Datum:** vrijdag 10 juli 2020 14:12:06

---

Geachte DEC 10.2.g

Op 03-03-2020 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Testen van een nieuw ,milder adjuvans in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie' met aanvraagnummer AVD10.2.g.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op een aanpassing in de NTS.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 9-7-2020.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies wordt helder vermeld welke vragen aan de aanvrager zijn gesteld. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



**Van:** [Info-zbo](#)  
**Aan:** ["Info-zbo"; Secretariaat OBDA](#)  
**Onderwerp:** NTS 20209464 Publicatie  
**Datum:** vrijdag 10 juli 2020 14:14:28  
**Bijlagen:** [NTS 20209464 Publicatie.pdf](#)

---

Hai Secretariaat,  
Willen jullie NTS 20209464 publiceren?  
Er zijn bijzonderheden: nee  
Beoordelen achteraf: Ja  
Bedankt

Groetjes 10.2.g

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.





## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Het testen van een nieuw adjuvant, met minder of geen bijwerkingen, om auto-immuunziektes van het brein te modelleren in resus apen
1.2 Looptijd van het project	5 jaar; start 01-04-2020 – eind 01-04-2023
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Verfijning, diermodel, ongerief, mild, auto-immuun ziektes

### 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.  <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<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)	<p>Auto-immuunziektes zijn aandoeningen waarbij het eigen lichaam het doelwit vormt van het immuunsysteem. Bekende voorbeelden van auto-immuunziektes zijn diabetes type I, reumatoïde artritis, lupus en multipale sclerose (MS).</p> <p>Gezien de complexiteit van dit soort ziektes, waarbij verschillende typen immuun cellen in het bloed geactiveerd raken en vervolgens in een orgaan schade aanrichten, zijn proefdier modellen nog steeds noodzakelijk om het ziekteproces beter te begrijpen en om medicijnen en therapieën te kunnen testen. Ondanks dat er modellen voor menselijke auto-immuunziektes in knaagdieren opgezet zijn, zijn deze niet voor alle doelstellingen geschikt. Wanneer dit het geval is, wordt er gebruik gemaakt van beter op de mens</p>
---	---



gelijkende modellen in apen, zoals in resus makaken.

Eén van de meest gebruikte diermodellen voor MS is het EAE model. EAE kan opgewekt worden in knaagdieren, maar ook in apen zoals marmosets en makaken. Deze modellen lijken in immunologisch en pathologisch opzicht sterk op de mens.

Om EAE in makaken op te wekken, zijn zeer sterke hulpstoffen (*adjuvantia*) zoals bijvoorbeeld Compleet Freund's adjuvant (CFA) noodzakelijk om de tolerantie voor lichaamseigen doelwitantigeen te doorbreken. Een belangrijk nadeel van CFA is dat het gebruik ervan gepaard kan gaan met ernstige bijwerkingen, zoals onderhuidse ontstekingsreacties. Deze bijwerkingen tasten het welzijn van de dieren aan en zijn mogelijk te voorkomen.

In het kader van verfijning, hebben wij een nieuw, mild adjuvant ontworpen, MiMyc genaamd, dat geen of zeer weinig bijwerkingen geeft. Dit project richt zich op het testen van dit nieuwe adjuvant in een pre-klinisch resus makaak model voor MS. Het uiteindelijke doel is om CFA in dit model te vervangen en zo het niet-ziekte gerelateerde ongerief van de dieren te verminderen.

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

Primair doel is het verkrijgen van een nieuw, mild adjuvant om daarmee het model voor auto-immuunziekten van het brein in de resus makaak te verfijnen en het ongerief van de dieren te verminderen. De bijwerkingen die het nu nog gebruikte adjuvant (CFA) in de resus makaak veroorzaakt zijn ernstig.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

10 resus makaken.

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

Het te testen adjuvant wordt geformuleerd en, onder narcose, intracutaan op verschillende plaatsen op de rug in kleine hoeveelheid geïnjecteerd. Te verwachten negatieve gevolgen voor het proefdier zijn sufheid en misselijkheid ten gevolge van de narcose. Daarnaast zijn er de ziekteverschijnselen behorend bij het diermodel, bijvoorbeeld het verlies van neurologische functies, waar de dieren last van zullen hebben.

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

Het cumulatieve ongerief wordt ingeschat als matig.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Alle dieren worden aan het einde van het experiment geëuthanaseerd. Om onderzoek te kunnen doen naar de pathologie in het brein en de immunresponsen in de lymfoïde organen is dit noodzakelijk.

## 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

De samenstelling van het te testen adjuvant is volledig met behulp van proefdiervrije technologie (bioassays voor aangeboren immunresponsen) tot stand gekomen, en ook de eerste analyses voor het mogelijk veroorzaken van bijwerkingen zijn *in vitro* gedaan.

We weten ondertussen dat het te testen adjuvant in resus makaken 1) zeer weinig tot geen lokale bijwerkingen geeft en 2) wel immunresponsen stimuleert. We weten nog niet of deze stimulatie ook voldoende is om een auto-immuunziekte te kunnen laten ontstaan, en dat is wel nodig wil het



gebruikt kunnen worden.

adjuvant CFA kunnen vervangen. Helaas is het nog niet mogelijk om op een proefdierlijke manier auto-immuunziekten na te kunnen bootsen. In het geval van ontstekingen van het brein (zoals bij MS) wordt dit veroorzaakt door complexe interacties tussen het brein en het gehele afweersysteem en zeer waarschijnlijk ook door omgevingsinvloeden en levensstijlen. Bestaande proefdierlijke alternatieven kunnen deze interacties –nog– niet nabootsen.

**4.2 Vermindering**

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

Dit is een *proof-of-principle* studie. Het minimum aantal dieren dat nodig is om met een redelijke mate van betrouwbaarheid vast te kunnen stellen dat een ziekte incidentie van 80% of hoger geïnduceerd wordt -het criterium ter bepaling of MiMyc een geschikte vervanging van CFA is- is 10 dieren.

**4.3 Verfijning**

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

De belangrijkste doelstelling van dit project is verfijning van een diersmodel voor auto-immuunziekten van het brein in de resus makaak. De noodzaak tot vervanging van CFA is groot in de resus makaak, gezien de heftigheid van de bijwerkingen in deze diersoort. Toch wordt dit model nog met regelmaat en wereldwijd gebruikt waardoor de impact van een nieuw milder adjuvant op dierenwelzijn groot zal zijn. Resultaten van dit onderzoek zullen middels publicatie beschikbaar gemaakt worden voor de internationale onderzoeksgemeenschap.

Ontwikkeling van een bijwerkingsvrij of bijwerkingsarm, maar toch potent, adjuvant zou op termijn mogelijk ook in modellen voor auto-immuunziekten in andere diersoorten (zoals in ratten, muizen en cavia's) tot verfijning kunnen leiden alhoewel daarvoor eerst proeven in de betreffende diersoorten nodig zullen zijn.

Tijdens de experimenten wordt onnodig ongerief vermeden door het gebruik van sedatie/pijnstilling.

Bij het bereiken van een van tevoren gesteld humane eindpunt worden de dieren geëuthanaseerd.

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

Training van dieren, sedatie en/of narcose, dagelijkse observatie, euthanasie op basis van humane eindpuntcriteria.

**5 In te vullen door de CCD**

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen