

nr.	documenten NTS20172664	wordt verstrek			weigeringsg ronden					
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.2, lid 2e	5.2, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraagformulier				x		x		x	
2	Projectvoorstel				x				x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x						
4	Bijlage dierproeven 1			x						
5	Bijlage dierproeven 2			x						
6	Bijlage dierproeven 3			x						
7	DEC-advies				x		x		x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x			
9	Verzoek aanvulling aanvraag 1				x		x			
10	Reactie aanvulling aanvraag 1				x		x			
11	Niet-technische samenvatting nieuw	x								
12	Verzoek aanvulling aanvraag 2				x		x			
13	Reactie aanvulling aanvraag 2				x		x			
14	Advies CCD				x					
15	Beschikking en vergunning				x		x		x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

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

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
 Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

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



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

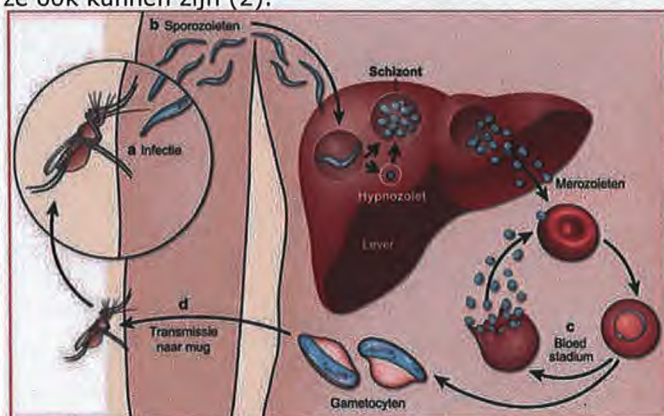
- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of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

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Malaria is een van de belangrijkste infectieziekten voor de mens, en treft vooral het armste deel van de wereldbevolking in de (sub)tropen. Malaria is een ernstige ziekte, soms met dodelijke afloop. Het grote aantal ziektegevallen in de betreffende landen heeft een grote negatieve invloed op de sociaal economische ontwikkeling in die landen. Jaarlijks sterven zo'n 500.000 mensen, vooral kinderen jonger dan 5 jaar, aan deze ziekte en 3,2 miljard mensen in 95 landen lopen risico op een malaria besmetting. Een goed werkend vaccin is nog steeds niet beschikbaar en de malaria parasiet wordt in hoog tempo resistent tegen de huidige geneesmiddelen. Onderzoek naar vaccins en nieuwe geneesmiddelen is dan ook zeer urgent om uiteindelijk malaria uit te roeien (1).

Malaria wordt veroorzaakt door Plasmodium parasieten, die door malaria muggen van de soort *Anopheles* worden overgedragen. Na een muggenbeet infecteren de parasieten (sporozoieten genaamd) eerst de lever, waar ze zich in 6-10 dagen vermenigvuldigen (figuur 1). Dit deel van de infectie is zonder symptomen. Als de geïnfecteerde levercel open barst komen er 10.000-40.000 nieuwe parasieten vrij, die rode bloedcellen infecteren en zich cyclisch ~10-voudig vermenigvuldigen. Dit bloedstadium veroorzaakt de ziekte malaria. In het bloed vormen zich ook geslachtelijke cellen die, wanneer opgenomen via een muggenbeet, en na bevruchting in de mug, uiteindelijk weer leiden tot sporozoieten in de speekselklieren van de mug.

Er zijn 5 Plasmodium soorten die ziekte geven in de mens, waarvan *P. falciparum* en *P. vivax* de belangrijkste zijn. De meeste doden worden door *P. falciparum* veroorzaakt, terwijl *P. vivax* ernstige ziekte en soms ook de dood van patiënten veroorzaakt. Plasmodium parasieten hebben een nauw gastheer bereik; er zijn Plasmodium soorten die vogels, reptielen, knaagdieren, apen en mensen van nature infecteren. De meeste apen malarias infecteren ook mensen en sommige zijn een belangrijke zoonose. De twee belangrijkste humane malarias (*P. falciparum* en *P. vivax*) infecteren experimenteel alleen chimpansees (worden niet meer gebruikt als model), *Aotus* en *Saimiri* apen. De parasieten moeten aan deze apen geadapteerd worden en meestal moeten de apen gesplenectomeerd worden om een bloedstadium infectie te kunnen krijgen. Door deze restricties en door de zeer beperkte beschikbaarheid van deze apensoorten voor biomedisch onderzoek worden deze modellen zelden gebruikt, hoe waardevol ze ook kunnen zijn (2).



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

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

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

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

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

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

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

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

Referenties

1. WHO, The Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030, January 2016
2. Herrera et al., Int J Parasitol. 2002;32(13):1625-35
3. Thomas et al., Acta Trop. 2016;160:35-8
4. Mikolajczak et al., Cell Host Microbe. 2015; 17:536-35
5. Schmidt, L.H. 1983, Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:231
6. Zeeman et al., Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(3):1586-95
7. Voorberg-van der Wel et al., PLoS One. 2013;8(1):e54888
8. Zeeman et al., Antimicrob Agents Chemother. 2016 Apr 22;60(5):2858-63

3.3 Belang

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

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

3.4 Onderzoeksstrategie

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

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

Zoals hierboven gezegd, zullen de 3 onderdelen gedurende de 5 jaar gelijktijdig uitgevoerd worden.

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

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

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

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

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

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

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

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



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Malaria is één van de belangrijkste infectieziekten. Het grote aantal ziektegevallen veroorzaakt door malaria zorgt ervoor dat kinderen niet naar school kunnen en volwassenen niet goed kunnen deelnemen aan het arbeidsproces. Dit heeft een desastreuze invloed op de sociaal economische ontwikkeling van de getroffen landen waar malaria in grote mate voorkomt. De ziekte veroorzaakt wereldwijd tot 500.000 doden per jaar en vele miljoenen worden ziek. Malaria in mensen wordt veroorzaakt door 5 verschillende parasieten van de soort *Plasmodium*. Er bestaan nog geen goed werkende vaccins en de malaria parasieten worden in hoog tempo resistent tegen

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

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

De verwachting is dat door het testen van heel veel chemische stoffen op hypnozoieten nieuwe middelen gevonden worden die hypnozoieten kunnen doden. Ook zal de nieuw opgedane kennis over de biologie van de hypnozoieten naar verwachting mogelijk zwakke plekken van de parasiet identificeren. Met die kennis kan dan gericht gezocht worden naar middelen die die zwakke plekken aanpakken. Zowel via grootschalig screenen, als via een gerichte aanpak van mogelijk zwakke plekken, zullen nieuwe stoffen ontdekt worden die verder getest en ontwikkeld kunnen worden tot nieuwe geneesmiddelen om met *P. vivax*-besmette mensen te genezen. Dit zijn de eerste stappen op weg naar controle en uiteindelijk uitroeiing van *vivax* malaria.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Voor de experimenten zullen in een periode van 5 jaar maximaal 248 resusapen nodig zijn, het aantal te gebruiken dieren is kleiner door de toepassing van hergebruik.

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

Handelingen kunnen stress veroorzaken. Dit wordt zoveel mogelijk beperkt door dieren te trainen voor eenvoudige handelingen. Voor complexere handelingen zullen dieren verdoofd worden om meer stress en pijn te voorkomen. Verder kunnen dieren mogelijk ziek worden door malaria besmetting.

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

Het ongerief is maximaal matig, maar in de meeste gevallen mild (55% van de dieren).

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Op het einde van elk experiment worden de dieren genezen van malaria en na controle kunnen ze dan deel blijven uitmaken van het dierbestand op het instituut en komen in aanmerking voor hergebruik. Dezelfde dieren kunnen meerdere van deze experimenten doorlopen, waardoor het aantal werkelijk in experiment gebruikte dieren lager zal uitvallen.

4 Drie V's

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

Het gebruik van een *in vitro* test voor het screenen van chemische/biologische stoffen op activiteit tegen hypnozoieten vervangt het vroeger gebruikte *in vivo* model (*P. cynomolgi* in resusapen) voor screenen en dit heeft geleid tot een zeer grote reductie in het gebruik van proefdieren. Echter, omdat de bloedstadia van malaria parasieten die hypnozoieten vormen niet *in vitro* gekweekt kunnen worden, moeten om aan de benodigde parasieten voor de leverstadium kweken te komen, dieren besmet worden met de malaria parasiet. Verder moeten mogelijke geneesmiddelen die in de leverstadium kweek ontdekt worden eerst getest worden op werking *in vivo*, voordat verdere ontwikkeling plaats kan vinden en de geneesmiddelen op mensen getest kunnen worden. Door het nauwe gastheer bereik van parasieten die hypnozoieten vormen-deze besmetten alleen mensen en apen- is het gebruik van apen in de keten van geneesmiddelen ontwikkeling onvermijdelijk.

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

Het aantal dieren dat gebruikt wordt in het screeningsproces van mogelijke geneesmiddelen en voor de ontdekking en validering van mogelijke processen in de hypnozoiet die gevoelig zijn voor geneesmiddelen, is gebaseerd op een zo hoog mogelijke doorloop snelheid. Het is uiteindelijk de bedoeling om wereldwijd miljoenen chemische stoffen te testen op activiteit, omdat de verwachting (en ervaring tot nu toe) is dat er maar weinig stoffen zullen zijn die de hypnozoiet echt kunnen doden en ook tot geneesmiddel voor mensen ontwikkeld kunnen worden. Alle experimenten zijn zo gepland dat de resultaten uit 1 experiment meegenomen kunnen worden in een vervolg experiment. Voor het *in vivo* testen van de werking van mogelijke geneesmiddelen wordt gebruik gemaakt van statistische analyses om tot de optimale groepsgrootte te komen. Waar mogelijk worden parasiet donor apen gecombineerd gebruikt voor verschillende experimenten, bijv. een donor aap voor *in vitro* screenen en voor een *in vivo* studie.

4.3 **Verfijning**
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar

Het onderzoek gebeurt in apen, omdat alleen enkele mensen- en apen malaria's hypnozoieten vormen. Door de opgedane ervaring met het

waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

diermodel zijn de protocollen verfijnd om het ongerief zo klein mogelijk te maken. Het ongerief wordt zoveel mogelijk beperkt door dieren te trainen voor eenvoudige handelingen, wat de stress aanzienlijk vermindert. Ook wordt het volgen van de parasitemie in het bloed tot een minimum beperkt, omdat bij benadering bekend is wanneer parasieten in het bloed verwacht kunnen worden. De klinische malaria verschijnselen in apen die besmet zijn zeer gering, omdat de dieren al vroegtijdig genezen worden en de gezondheidstoestand van de dieren nauwkeurig geobserveerd wordt. De opgedane biologische kennis zal aangeven wat mogelijk zwakke plekken zijn in de hypnozoïet, die aangepakt kunnen worden met nieuwe geneesmiddelen.

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

Grotere bloedafnames, infecties en geneesmiddel doseringen via een maagsonde worden uitgevoerd onder verdoving. Het gebruik van getrainde dieren die vrijwillig meewerken aan bepaalde procedures (verdoving, geneesmiddel toediening, afnemen van een druppel bloed) vermindert de stress. Tijdens de infectie worden de dieren geobserveerd. Als ziekteverschijnselen optreden worden de dieren onmiddellijk genezen van malaria.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 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 | Malaria infectie van resusapen |

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.

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

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

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

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

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

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

In alle gevallen wordt als volgt te werk gegaan. Na i.v. injectie (onder sedatie) van bloedstadium parasieten (uit een ingevroren stock of vers afkomstig van een andere geïnfecteerde aap) of van sporozoitien (optie b-1), wordt de ontwikkeling van bloedstadium parasitemie gevolgd door regelmatig bloedsmeertjes te maken van een druppel bloed, verkregen vanuit een prikje met een naald in het bovenbeen. Bij voldoende hoge parasitemie (>0,2% van de rode bloedcellen is geïnfecteerd; in uitzonderlijke gevallen, als blijkt dat de parasitemie niet verder oploopt, kan ook bij een lagere parasitemie gebloed worden) in de juiste ontwikkelingsstadia (primaire uitkomst parameter) wordt bloed afgenomen om *ex vivo* malaria muggen te voeden voor sporozoit productie of voor het opwerken van bloedstadium parasieten (alle grotere bloedafnames worden gedaan onder sedatie).

Bij transfectie studies (optie b-2) wordt geïnfecteerd bloed afgenomen om de bloedstadium parasieten op te zuiveren om ze daarna te transfecteren. De transfectie constructen bevatten een resistentie merker tegen een chemische stof. De getransfecteerde parasieten worden vervolgens in een ontvanger aap gespoten. De dieren krijgen de chemische stof toegediend om de getransfecteerde parasieten te selecteren; alleen succesvol getransfecteerde parasieten kunnen die behandeling overleven. Als de parasitemie na behandeling hoog genoeg is (zelfde criteria als hierboven genoemd) wordt bloed afgenomen om muggen te voeden voor leverstadium onderzoek en/of stocks te maken. Wanneer de parasitemie laag blijft en geen muggen gevoed kunnen worden, wordt bloed afgenomen om een tweede ontvanger aap te infecteren, waarin de parasieten meestal beter uitgroeien, zodat muggen voedingen kunnen worden uitgevoerd. Bij alle hiervoor beschreven bloedstadium infecties worden de apen aan het eind van het experiment genezen van malaria.

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

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

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

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

B. De dieren

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

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

- a) 90 dieren voor drug screening
 - b) 48 dieren voor een geschat aantal van 8 transfectie rondes (6 dieren per transfectie ronde)
 - c) 30 dieren voor productie van wildtype en transgene parasieten voor verder onderzoek
 - d) 5 dieren als parasiet donor voor *in vivo* drug efficacy evaluatie.
- Het totaal aantal gebruikte dieren in 5 jaar zal waarschijnlijk lager uitvallen, omdat parasiet donoren na 6 maanden hergebruikt kunnen worden in hetzelfde experiment.

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

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

- b) Voor *in vivo* transfecties is 1 parasiet donor aap nodig om voldoende bloedstadia te zuiveren voor transfectie. Met die parasieten kunnen ca. 3 verschillende transfecties uitgevoerd worden, waarvoor 3 ontvanger apen nodig zijn om de transfectanten te kunnen selecteren. We rekenen met nog 2 extra secundaire ontvanger apen, om bijv. parasieten die niet zo goed groeien verder te kunnen propageren in deze ontvangers om dan muggen te kunnen voeden met bloed waarin zich voldoende parasieten bevinden voor transmissie. Met naar schatting 8 transfectie rondes in 5 jaar tijd is er voldoende tijd om alle transfecties uitvoerig te karakteriseren en de resultaten mee te nemen in de volgende ronde.
- c) Verder hebben we ca. 6 apen per jaar nodig voor propagatie van succesvolle transfectanten en/of wildtype parasieten voor verdere leverstadium studies, of om bijv. voldoende bloedstadium parasiet stocks te maken voor verder gebruik.
- d) We verwachten ca. 5 drug efficacy studies uit te voeren in 5 jaar. Om deze dieren met sporozoieten te kunnen infecteren (bijlage 3), hebben we 5 parasiet donor apen nodig.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

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

X Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

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

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

afhankelijk van de transfectie methode die voor het specifieke experiment nodig is). Het efficiënte gebruik van donor apen vermindert het aantal benodigde donor apen voor transfectie studies. Indien de parasitemie het toelaat in de ontvanger apen na transfectie, zullen we ook al muggen voeden op het bloed van de primaire ontvangers, om al pilot studies op leverstadia van getransfecteerde parasieten uit te kunnen voeren. Dit kan alleen als de parasieten na transfectie voldoende uitgroeien in de primaire ontvanger apen. Als voor bepaalde transfectanten al voldoende informatie verkregen is zal een secundaire ontvanger niet gebruikt worden.

Verfijning. Het bloedstadium parasitemie verloop van *P. cynomolgi* in resusapen is redelijk voorspelbaar, zowel bij bloedstadium als bij sporozoiet infecties. Hierdoor kunnen we het aantal benodigde bovenbeen prikjes om de parasitemie te volgen tot een minimum beperken, in ieder geval voor de wildtype parasiet infecties. Voor de getransfecteerde parasieten is dit minder voorspelbaar, maar daar plannen we bovenbeen prikjes op strategische momenten rond periodes waarop parasieten verwacht worden, om de dieren zo min mogelijk lastig te vallen en toch de parasitemie ontwikkeling zo goed mogelijk te kunnen volgen. Bovendien maken we gebruik van getrainde dieren (positive reinforcement training), die vrijwillig hun bovenbeen aanbieden voor een prikje, waarna ze een beloning ontvangen. Dit vermindert de stress bij de dieren. De muggenvoedingen gebeuren *ex vivo*, zodat de dieren geen last hebben van (veel) muggenbeten. Na infectie worden de dieren dagelijks gescoord op klinische symptomen m.b.v. een klinische scoringslijst.

Milieu effecten. *P. cynomolgi* is een klasse 2 organisme en experimenten met deze parasiet gebeuren onder inperkingsniveau 2. De productie van transgene parasieten is door de COGEM ingeschaald op inperkingsniveau 2 (DMII en MLII). Geïnfecteerde muggen worden gehanteerd in een speciaal ingericht muggen laboratorium, waarbij de werk protocollen toegespitst zijn op het voorkomen van ontsnappen van malariamuggen. Voor zover bekend zijn er in Nederland geen muggen populaties die transmissie kunnen veroorzaken van *P. cynomolgi*.

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

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

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Niet van toepassing; dit is geen wettelijk vereist onderzoek.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

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.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Ongerief door het bijkomen uit de sedatie

Milde malaria symptomen kunnen optreden. Dit zijn koortspieken als boven beschreven, al dan niet vergezeld van gebrek aan eetlust en/of verminderde activiteit. Dit treedt alleen op bij hogere parasitemieën en gedurende een korte periode wanneer parasieten uit geïnfecteerde rode bloed cellen barsten.

Bij behandeling met chloroquine kan bij sommige apen een korte periode van verminderde activiteit en eetlust optreden. Primaquine geeft geen bijwerkingen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Bijkomen uit de sedatie kan desoriëntatie en misselijkheid veroorzaken

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

Milde ziekte verschijnselen zijn een bijwerking van chloroquine.

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

De dieren worden 16 uur voor sedatie nuchter gehouden, om te voorkomen dat de dieren gaan overgeven bij het ontwaken uit de sedatie.

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

J. Humane eindpunten

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

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

<1%

K. Classificatie van ongerief

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

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

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---------------------------|
| 2 | PK/PD studie in resusapen |

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.

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

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

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

Parasiet infecties gebeuren d.m.v. i.v. injectie onder sedatie. Veelal zal het te testen middel oraal toegediend worden (via gavage onder sedatie), 1 x per dag gedurende 1-5 achtereenvolgende dagen. Na de toediening zullen kleine bloedmonsters (ca 1 ml) worden afgenomen (onder sedatie) op regelmatige tijden (tot ca. maximaal 8 afnames/24 uur, op 1-3 dagen van toediening), waarin de concentratie van het te testen middel bepaald wordt. Bij herhaaldelijke toedieningen/bloedingen waarbij de dieren gesedeerd worden, zal ook 1x per dag extra voedsel worden toegediend via gavage, na toediening van het te testen middel.

Kleine bloedafnames gebeuren door een naald prik in het bovenbeen (ca. 45x in 100 dagen tijd). Dieren worden getraind voor meewerken aan deze procedure d.m.v. positive reinforcement training, en beloond met iets lekkers. Genezing van malaria gebeurt door i.m. injecties met een anti-malaria middel dat bloedstadia doodt en een ander middel (oraal gedoseerd, na training van de dieren om uit een spuit te drinken) om alle hypnozoieten te doden. Een PK/PD studie in geïnfecteerde dieren duurt maximaal 100 dagen, in ongeïnfecteerde dieren is dat minder dan een week.

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

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

B. De dieren

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

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

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

parasieten.

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

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. Indien met geïnfecteerde apen gewerkt wordt: Door het beperkte gastheer bereik van *P. cynomolgi* zijn alleen makaak soorten, met name resusapen, te gebruiken voor dit type onderzoek. Er bestaan wel malaria soorten die knaagdieren infecteren, maar die vormen geen hypnozoieten. Deze komen alleen voor bij malaria soorten die mensen en apen infecteren. Voor de PK/PD studie worden resusapen gebruikt omdat het metabolisme veel lijkt op dat van de mens, en de effectiviteitsstudie ook in resusapen plaats vindt (bijlage 3). Indien mogelijk zullen *in vivo* PK studies vervangen worden door zgn. *in silico* PBPK studies (physiologically based pharmacokinetic modeling), waarbij wiskundige modellen de absorptie, distributie, metabolisme en excretie van stoffen in mensen en dieren proberen te voorspellen.

Vermindering. Met 3 dieren kan een goede dosisbepaling uitgevoerd worden. Als er 1 uitbijter is, kan nog steeds die bepaling plaatsvinden; met 2 dieren zou dat niet meer kunnen. Als met geïnfecteerde dieren gewerkt wordt is een profylactische studie tijdens de effectiviteitsstudie niet meer nodig.

Verfijning. In overleg met de ontwikkelaar van de geneesmiddelen worden minimale hoeveelheden bloed op zo min mogelijk tijdstippen afgenomen, waarbij toch tot een goede PK/PD analyse gekomen kan worden. Omdat we bij geïnfecteerde dieren in grote lijnen weten wanneer we parasieten in het bloed kunnen verwachten, kunnen we de timing van de bovenbeen prikjes daarop afstemmen, waardoor in totaal minder prikjes nodig zijn, terwijl we toch de parasitemie ontwikkeling goed vast kunnen leggen. De dieren zijn getraind voor het meewerken aan bovenbeen prikjes. Voor de orale toediening van primaquine worden de dieren ook getraind voor het vrijwillig drinken uit een spuit. Om de bittere smaak van primaquine enigszins te maskeren, wordt een zoete siroop gebruikt.

Milieu effecten. *P. cynomolgi* is een klasse 2 organisme en experimenten met deze parasiet gebeuren onder inperkingsniveau 2 (DMII en MLII).

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

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

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Niet van toepassing; dit is geen wettelijk vereist onderzoek.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

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.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

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

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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

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

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

<1%

K. Classificatie van ongerief

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

Matig ten gevolge van herhaaldelijk sederen in korte tijd.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

x Nee

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 3 | In vivo effectiviteitsstudie in resusapen |

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.

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

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

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

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

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

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

B. De dieren

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

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

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

hebben van ontwikkelende immuniteit tegen malaria parasieten.

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

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. Door het beperkte gastheer bereik van *P. cynomolgi* zijn alleen makaka soorten, met name resusapen, te gebruiken voor dit type onderzoek. Er bestaan wel malaria soorten die knaagdieren infecteren, maar die vormen geen hypnozoieten. Deze komen alleen voor bij malaria soorten die mensen en apen infecteren. Voor het op grote schaal testen van vele stoffen hebben we een *in vitro* platform ontwikkeld; stoffen die hieruit naar voren komen en geoptimaliseerd zijn moeten eerst in het diermodel getest worden op *in vivo* activiteit, voordat met klinische trials kan worden begonnen.

Vermindering. Met een powercalculatie zoals hierboven beschreven wordt het minimale aantal dieren per groep bepaald dat nodig is om tot significante uitkomsten te komen.

Verfijning. We maken gebruik van getrainde dieren die vrijwillig hun bovenbeen aanbieden voor een prikje met een naald om een druppel bloed af te nemen (positive reinforcement training). Daarna krijgen ze een beloning. Deze procedure vermindert de stress bij de dieren voor dit soort procedures. Omdat we in grote lijnen weten wanneer we parasieten in het bloed kunnen verwachten, kunnen we de timing van de prikjes daarop afstemmen, waardoor in totaal minder prikjes nodig zijn, terwijl we toch de parasitemie ontwikkeling goed vast kunnen leggen. Voor de orale toediening van primaquine worden de dieren getraind voor het vrijwillig drinken uit een spuit. Om de bittere smaak van primaquine enigszins te maskeren, wordt een zoete siroop gebruikt.

Milieu effecten. *P. cynomolgi* is een klasse 2 organisme en experimenten met deze parasiet gebeuren onder inperkingsniveau 2 (DMII en MLII).

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

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

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Niet van toepassing; dit is geen wettelijk vereist onderzoek.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

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.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

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

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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

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

J. Humane eindpunten

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

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

<1%

K. Classificatie van ongerief

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

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

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD5020020172664
2. Titel van het project: *Plasmodium cynomolgi* in resus apen als model voor *P. vivax* malaria in mensen voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia.
3. Titel van de NTS: De ontwikkeling van geneesmiddelen tegen malaria inclusief slapende lever stadia.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: 10.2.g
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e
 - e-mailadres contactpersoon: 10.2.e
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 24-07-2017
 - aanvraag compleet: 24-07-2017
 - in vergadering besproken: 02-08-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-08-2017 tot 11-08-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 11-08-2017
 - advies aan CCD: 17-08-2017
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend bij de DEC.

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

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

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

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen onderzoek naar parasitaire pathogenen, statistische analyse, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming. De DEC heeft ruime ervaring met het beoordelen van de modellen die gebruikt worden voor screenen en evalueren van nieuwe geneesmiddelen tegen malaria in niet-humane primaten.
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Een van de DEC leden is betrokken bij de aanvraag. Deze persoon heeft zich teruggetrokken van de vergadering bij de bespreking van de aanvraag en heeft geen aandeel gehad in de afweging en advisering.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het voorgestelde onderzoek bestaat uit drie onderdelen, te weten 1) het op grote schaal *in vitro* screenen van potentieel nieuwe geneesmiddelen, 2) *in vivo* evaluatie van potentieel nieuwe geneesmiddelen en 3) ontwikkelen van genetisch gemodificeerde parasieten. De genetisch gemodificeerde parasieten zullen of een "merker" gen krijgen, waardoor ze beter te detecteren zijn, of een verandering ondergaan in een gen dat een mogelijke drug target is. Deze genetisch gemodificeerde parasieten zullen bijdragen aan de selectie van effectieve geneesmiddelen tegen malaria, enerzijds door inzicht te verschaffen in de werkingwijze en eigenschappen van het geneesmiddel en anderzijds door verbetering van de screenings methode (onderdeel 1). De subdoelen sluiten logisch aan bij het hoofddoel en vormen een samenhangend geheel en zijn noodzakelijk om het hoofddoel te bereiken. Screening van nieuwe geneesmiddelen onder 1) leidt tot evaluatie van effectiviteit *in vivo* (2) en bepaling van de betrokken moleculaire pathways door experimenten met genetische gemodificeerde parasieten leidt tot verdere ontwikkeling en verbetering van het geneesmiddel. Het verwachte ongerief voor de dieren is duidelijk omschreven en de uitkomsten van deze experimenten zijn helder en meetbaar. Het aantal dierproeven is realistisch ingeschat en voor zover mogelijk statistisch onderbouwd. De klinische eindpunten zijn duidelijk gedefinieerd.
2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Neven doelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorie, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek', sluit aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag worden nieuwe kandidaat geneesmiddelen tegen malaria eerst *in vitro* en daarna *in vivo* onderzocht op hun effectiviteit tegen malariaparasieten. Met de hier gebruikte *in vitro* methode kunnen naar schatting 150.000 nieuwe kandidaat geneesmiddelen getest worden in een periode van 5 jaar. Voor het verkrijgen van parasieten voor deze *in vitro* studies zijn op gezette tijden proefdieren nodig. Door verdere *in vivo* evaluatie van een zeer beperkt aantal meest belovende geneesmiddelen wordt belangrijke informatie verkregen voor verdere klinische ontwikkeling.

Belangen en waarden

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

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

Voor de te genezen personen is het beschikbaar komen van een effectief middel tegen malaria van groot belang, aangezien er momenteel maar 1 medicijn is tegen deze specifieke vorm van malaria waarbij slapende stadia in de lever optreden en de parasiet resistent aan het worden is tegen dit medicijn. Zonder effectieve medicijnen is de infectie blijvend en zullen regelmatig nieuwe ziekte periodes optreden. Dit heeft een ernstig nadelig effect op het welzijn en functioneren van de geïnfecteerde persoon. Alleen met het beschikbaar komen van nieuwe geneesmiddelen kan deze vorm van malaria bestreden worden.

Het belang voor de samenleving is dat met malaria geïnfecteerde personen genezen worden. Hierdoor wordt ook de verdere verspreiding, door muggen, onder de menselijke populatie voorkomen. Dit resulteert in; een sterke verbetering van de gezondheid van grote groepen mensen, een sterke beperking van de uitgaven voor verpleging en medicatie en minder verlies in economische productiviteit.

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

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

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

Proefopzet en haalbaarheid

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

Welzijn dieren

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

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

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met plasmodium soorten die gekenmerkt worden door aanwezig zijn van slapende leverstadia, en die een grote gelijkenis vertonen met dergelijke plasmodium soorten bij de mens. Deze apen parasieten kunnen zelf ook in beperkte mate in de mens voorkomen. De kandidaat geneesmiddelen worden in eerste instantie getest in een *in vitro* model, waarvoor echter bloed van een geïnfecteerd dier nodig is. Daarnaast zal door *in vivo* experimenten worden vastgesteld of en in hoeverre de geselecteerde kandidaat geneesmiddelen in aanmerking komen voor verdere klinische evaluatie. De resultaten verkregen in dit proefdiermodel kunnen in belangrijke mate een beschermend effect tegen deze vorm van malaria in de mens voorspellen. Eventueel waargenomen bijwerkingen zijn eveneens relevant voor de mens.

Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Ook gebruik in een eerdere malaria studie vormt, na een rustperiode van 6 maanden, geen belemmering voor hergebruik. Het werkelijke aantal dieren die binnen dit project gebruikt gaan worden zal daardoor lager uitvallen. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III.
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief is op basis van ervaring met malaria infectie studies en PK studies in niet-humane primaten correct als licht ingeschat voor het merendeel van de studies waarbij malaria infectie van resusapen plaats vindt voor sporozooïet en bloedstadium parasiet productie (bijlage 1) en matig voor de PK/PD en *in vivo* effectiviteits studies (bijlage 2 en 3). Het ongerief wordt veroorzaakt door de experimentele technieken, de toegediende geneesmiddelen en de klinische symptomen ten gevolge van de infectie. Monitoren van klinische symptomen en veelvuldig meten van de parasitemie wordt gebruikt om tijdig in te grijpen en de dieren te genezen voordat ernstige ziekteverschijnselen optreden. De dieren zijn speciaal voor dit doel gefokt, en zullen als sociaal compatibel duo worden gehuisvest.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de dieren te infecteren met malaria en door de toediening van geneesmiddelen tegen malaria. Deze aantasting is van voorbijgaande aard, de dieren keren naderhand terug naar hun oorspronkelijke toestand, qua gezondheid en welzijn.
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe. Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de kans dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken terecht als zeer laag ingeschat.
14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. In dit project wordt een *in vitro* model gebruikt voor de screening van een zeer groot aantal kandidaat geneesmiddelen tegen malaria. Echter de sporozoitien die nodig zijn in dit *in vitro* model kunnen alleen verkregen worden door muggen te infecteren met parasieten die aanwezig zijn in bloed van geïnfecteerde dieren. Ook bij deze infectie wordt een *in vitro* techniek gebruikt waardoor voorkomen wordt dat de apen door de muggen gestoken moeten worden. De malaria parasiet zelf is echter nog niet *in vitro* te kweken. Daarom blijven geïnfecteerde dieren nodig. Alleen de meest geschikte kandidaten geneesmiddelen worden vervolgens *in vivo* getest. Of een kandidaat geneesmiddel werkzaam is tegen hypnozoieten kan alleen getest worden in makaken, aangezien malaria parasieten die deze vorm van malaria veroorzaken en bovendien sterk lijken op de bij de mens voorkomende parasiet alleen in makaken voor komen. Door de experimenten in niet-humane primaten kunnen inzichten in effectiviteit en mogelijke bijwerkingen naar voren komen die bij onderzoek met andere diersoorten gemist zouden zijn. Deze stap over te slaan en direct onderzoek met menselijke vrijwilligers te verrichten is in dit stadium van de ontwikkeling de kandidaat geneesmiddelen dan ook niet verantwoord.
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe. Het ontwikkelde model om stadia van de malaria parasiet, m.n. hypnozoieten, *in vitro* te kweken maakt het mogelijk om grote aantallen kandidaat geneesmiddelen te screenen op mogelijke werkzaamheid. Met deze strategie wordt het zoeken naar behandelingen voor malaria beter mogelijk en tevens het gebruik van proefdieren voor drug screening geminimaliseerd. Het aantal dieren dat nodig is voor de drug screening en de transfecties is nauwkeurig beschreven en tot een minimum beperkt. Ook voor de PK studies wordt alleen het strikt noodzakelijk aantal dieren gebruikt. Het aantal benodigde dieren voor de *in vivo* evaluatie (bijlage 3) wordt bepaald met behulp van statische powerberekeningen op basis van de verwachte tijd tot relapse en op basis van een 2x2 contingency tabel. Bij het onderzoeken van meerdere kandidaten geneesmiddelen binnen een proefopzet zal het aantal controlegroepen beperkt worden. Er wordt opgemerkt dat het aantal gebruikte dieren geringer is dan het aantal dierproeven door het toepassen van hergebruik.
16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe. De uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren die goed aan mensen gewend zijn, de dieren zijn bovendien getraind om zo veel mogelijk mee te werken aan bepaalde dier technische handelingen, waardoor ze minder stress ervaren. Sedatie wordt toegepast wanneer geïndiceerd. Bij onverwacht grotere welzijnsaantasting dan voorzien zal een humaan eindpunt worden toegepast. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. In onderhavige projectaanvraag worden dieren van beide geslachten gebruikt.
19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. De dieren zullen in leven blijven aan het einde van het project.
20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. Hergebruik is mogelijk, ook binnen dit project (mits er na infectie een tussenperiode van 6 maanden in acht wordt genomen). Hergebruik zal plaats vinden binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke criteria ten aanzien van de dierproef.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het testen van nieuwe kandidaat geneesmiddelen tegen malaria het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen.
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
 - ✓ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - ✓ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IVD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus. De belanghebbende die lid is van de DEC heeft geen aandeel gehad in de totstandkoming van dit advies.
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.



8

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020172664
Bijlagen
1

Datum 18 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte Dr. Langermans,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 augustus 2017. Het gaat om uw project "Plasmodium cynomolgi als model voor P. vivax malaria voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020172664. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier

Datum:

18 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD5020020172664

Datum:
18 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172664

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
18 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172664

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

Naam: 10.2.e
Postbus: 3306
Postcode en plaats: 2288 GJ RIJSWIJK

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

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 december 2017

Geplande einddatum:

30 november 2022

Titel project:

Plasmodium cynomolgi als model voor P. vivax malaria voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia

Titel niet-technische samenvatting:

De ontwikkeling van geneesmiddelen tegen malaria inclusief slapende lever stadia

Naam DEC:

10.2.g

Postadres DEC:

10.2.g

E-mailadres DEC:

10.2.e

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.541,-

De leges voldoet u:

via eenmalige incasso

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

 Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

 Melding Machtiging
 DEC-advies**Ondertekening**

Naam:

10.2.e

Functie:

10.2.g

Plaats:

Rijswijk

Datum:

17 augustus 2017

Datum:

18 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD5020020172664

10.2.e

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

Geachte 10.2.e

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

- U geeft aan random te gaan screenen met als doel zoveel mogelijk targets te vinden. U bent van plan ca 150.000 stoffen te screenen. Hiervoor zijn 90 dieren nodig. Uit de overige bijlagen maken wij op dat de opbrengst van deze methode vrij laag is, u verwacht maar 5 kandidaten in vivo te kunnen gaan testen. U wordt, in het kader van vermindering, verzocht toe te lichten waarom een meer gerichte approach niet mogelijk is en of het mogelijk is keuzemomenten in te bouwen tijdens de screening.
- U geeft aan dat dieren van Indiase afkomst gebruikt worden. Voor de volledigheid wordt u verzocht aan te geven waar de dieren gekocht worden of dat deze zelf gefokt worden.
- U geeft aan dat het benodigd aantal dieren in bijlage 3.4.4.1 uiteindelijk lager zal uitvallen, omdat dieren hergebruikt kunnen worden. Het is onduidelijk hoeveel dieren naar verwachting hergebruikt kunnen worden en of het aantal dieren niet op voorhand naar beneden bijgesteld kan worden. U wordt verzocht dit toe te lichten.
- De NTS is te lang. Een NTS mag maar uit circa 500 woorden bestaan. U wordt verzocht deze in te korten.

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: Info-zbo

Verzonden: vrijdag 18 augustus 2017 11:30

10.2.e

Onderwerp: OntvangstBevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD5020020172664

Geachte 10.2.e

Vriendelijk verwijs ik u naar de brief en de bijlagen.

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Namens:

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Antwoorden op vragen aanvraagnummer AVD5020020172664

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

Wij verwachten inderdaad dat de random screening maar een beperkt aantal 'hits' zal opleveren. Dit is gebaseerd op de ervaring van random screenen sinds de jaren 50 van de vorige eeuw, waarbij in vivo gescreend werd, en onze huidige ervaring met -beperkt- in vitro screenen. Tezamen heeft dit screenen slechts 8-aminoquinolines opgeleverd als actieve moleculen, waarvan Primaquine al lange tijd het enige klinisch gebruikte geneesmiddel is en Tafenoquine op dit moment in fase 3 klinische trials getest wordt. Wereldwijd zijn naar schatting nog maar een paar duizend stoffen getest, in vivo of in vitro, en de verwachting is dat screenen met een hogere throughput tot meer succes zal leiden, omdat veel meer verschillende chemische structuren getest kunnen worden. Overigens zullen niet alle 'hits' tot bruikbare stoffen leiden die tot medicijnen ontwikkeld kunnen worden en de bruikbare 'hits' zullen worden geprioriteerd voor het in vivo testen. Wij verwachten alleen de beste 5 te kunnen testen in de komende 5 jaar.

Er zitten zeker keuzemomenten in het screeningsproces. Als bijvoorbeeld tijdens de screening blijkt dat een bepaalde klasse van kinase inhibitors goede activiteit vertonen, zullen chemische stoffen die op die kinases werken een speerpunt vormen in de screening om zo snel mogelijk tot een optimale stof te komen die in vivo getest kan worden.

Overigens, omdat de succes rate van hit naar geneesmiddel kleiner is dan 10%, moeten zoveel mogelijk hits gevonden worden, ook met verschillende manier van werking om resistentie ontwikkeling tegen de nieuwe middelen te kunnen ondervangen.

Een meer gerichte aanpak wordt ook gevolgd, zoals beschreven in de aanvraag. Een deel van het onderzoek is er namelijk op gericht om via transcriptomics en proteomics nieuwe drug targets te identificeren. Met deze targets kunnen dan in vitro (enzym)assays ontwikkeld worden om specifieke verzamelingen van chemische stoffen te testen.

Eventuele 'hits' uit dit soort assays zullen dan formeel nog in de in vitro parasiet assay getest moeten worden, om te laten zien dat stoffen die de werking van bepaalde enzymen die in de parasiet tot expressie komen verhinderen, ook de parasiet in de levercel kunnen doden. Deze aanpak geeft samen met de random screening aanpak de grootste kans om zoveel mogelijk 'hits' te vinden.

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

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

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

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

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

Een nieuwe, kortere NTS is bijgevoegd

10.2.e

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

Geachte 10.2.e,

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

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

Geachte

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

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

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

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

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: Info-zbo

Verzonden: vrijdag 18 augustus 2017 11:30

Aan: 10.2.e

CC: 10.2.e

Onderwerp: OntvangstBevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD5020020172664

Geachte 10.2.e

Vriendelijk verwijs ik u naar de brief en de bijlagen.

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Namens:

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Antwoorden op aanvullende vraag aanvraagnummer AVD5020020172664

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

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



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

Advies aan CCD

B

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

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

Proces	Het Secretariaat heeft de aanvrager een vraag gesteld over het aantal dieren dat hergebruikt kan worden, de herkomst van de dieren, de screening en de lengte van de NTS. De antwoorden op deze vragen zijn nog niet ontvangen.
--------	---

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

In dit project worden non humane primaten gebruikt.
CITAAT.

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

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

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

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

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

2 DEC advies

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

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

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

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

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

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

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

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

bevorderen.

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

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

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

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

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

3 Kwaliteit DEC advies

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

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	Geen van de medewerkers van het Secretariaat heeft een arbeidsrelatie gehad met de aanvrager die minder dan 5 jaar geleden is beëindigd of heeft andere belangen die mogelijk zouden kunnen leiden tot oneigenlijke beïnvloeding.
Doelstelling Doelstelling	CITAAT. De algemene doelstelling van dit project is het screenen van potentieel nieuwe geneesmiddelen op activiteit tegen malaria hypnozoieten, om ze dan verder te kunnen ontwikkelen tot medicijnen.

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

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

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

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

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

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

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

5 Samenvatting

Het projectvoorstel bevat voldoende informatie over het belang van het onderzoek, de strategie, de handelingen die de dieren ondergaan, de 3V's en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen.

In deze aanvraag worden resusapen gebruikt voor onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen tegen een specifieke malariasoort. De aanvrager geeft aan dat het voor onderzoek naar medicijnen tegen deze specifieke malariasoort niet mogelijk is om bijvoorbeeld knaagdieren te gebruiken. Hoewel knaagdieren wel geïnfecteerd kunnen worden, worden in knaagdieren, in tegenstelling tot de mens en resusapen, geen hypnozoieten gevormd. Het onderzoek is specifiek gericht op hypnozoieten, omdat deze slapende stadia na langere periodes opnieuw gereactiveerd kunnen worden en individuen opnieuw besmettelijk zijn voor muggen. Het Secretariaat is van mening dat de aanvrager in voldoende mate heeft onderbouwd waarom het niet mogelijk is knaagdieren te gebruiken voor dit onderzoek en waarom apen nodig zijn.

De aanvrager geeft aan random te gaan screenen met als doel zoveel mogelijk targets te vinden. De aanvrager is van plan ca 150.000 stoffen te screenen. Hiervoor zijn 90 dieren nodig. Hoewel de experimenten ex vivo uitgevoerd worden waardoor het ongerief van de dieren beperkt blijft, is het Secretariaat van mening dat er veel apen nodig zijn voor een dergelijke screening. Bovendien lijkt de opbrengst van deze methode erg laag. De aanvrager verwacht maar 5 kandidaten in vivo te gaan testen. Het Secretariaat heeft de aanvrager daarom gevraagd toe te lichten waarom een meer gerichte approach niet mogelijk is en of het mogelijk is keuzemomenten in te bouwen tijdens de screening.

De aanvrager geeft aan dat dieren van Indiase afkomst gebruikt worden. Voor de volledigheid is de aanvrager gevraagd aan te geven waar de dieren gekocht worden of dat deze zelf gefokt worden.

Er is sprake van hergebruik. Dieren die in dit project worden gebruikt, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. De aanvrager geeft aan hierbij de wettelijke kaders te hanteren.

De aanvrager geeft daarnaast aan dat het benodigd aantal dieren in bijlage 3.4.4.1 uiteindelijk lager zal uitvallen, omdat dieren hergebruikt kunnen worden. Het is onduidelijk hoeveel dieren naar verwachting hergebruikt kunnen worden en of het aantal dieren niet naar beneden bijgesteld moet/kan worden. Het antwoord op deze vraag is nog niet ontvangen.

De aanvrager geeft aan PK/PD studies uit te voeren. Indien mogelijk zullen de in vivo PK studies echter vervangen worden door physiologically based pharmacokinetic modeling.

De NTS is te lang. Het Secretariaat heeft de aanvrager gevraagd deze in te korten.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat volgt het DEC-advies, maar stelt voor aanvullende algemene voorwaarde(n) te stellen. Het Secretariaat adviseert dit project toe te wijzen als de vragen naar tevredenheid worden beantwoord.

Voorstel is om de vergunning te verlenen van 1-12-2017 tot en met 30-11-2022. Hierbij stelt het Secretariaat voor de volgende voorwaarden te stellen:

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk november 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

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



15

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020172664
Bijlagen
1

Datum 17 oktober 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

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

Beslissing

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

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 december 2017 tot en met 30 november 2022.

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

Aanvullende opmerkingen

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

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

Datum:
17 oktober 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172664

Nadere vragen aanvrager

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

Overwegingen

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

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

Beoordeling achteraf

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

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Datum:

17 oktober 2017

Aanvraagnummer:

AVD5020020172664

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2.g



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 december 2017 tot en met 30 november 2022, voor het project "Plasmodium cynomolgi als model voor P. vivax malaria voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen slapende lever stadia" met aanvraagnummer AVD5020020172664, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Afdeling hoofd.

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

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

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

Aanvraagnummer:

AVD5020020172664

Voorwaarden*Beoordeling achteraf*

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

Ter informatie

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

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



Aanvraagnummer:

AVD5020020172664

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD5020020172664

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Levensloopdossier

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

Niet-menselijke primaten

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

Beoordeling achteraf

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

Aanvraagnummer:

AVD5020020172664

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