

Inventaris Wob-verzoek W21-04		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS20185886	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraagformulier				x		x		x	
2	NTS	x								
3	projectvoorstel				x		x		x	
4	Bijlage dierproeven			x						
5	Ontvangstbevestiging				x		x		x	
6	DEC advies				x				x	
7	aanvullende vragen				x		x			
8	aanvullende informatie				x		x		x	
9	projectvoorstel definitief				x		x		x	
10	bijlage definitief			x						
11	NTS definitief	x								
12	Advies CCD				x		x			x
13	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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	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 X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	10.2.g
		Afdeling	10.2.g
		Telefoonnummer	010.2.e
		E-mailadres	10.2.e
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters  Dhr.  Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- 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 - 08 - 2018
- Einddatum 31 - 07 - 2023
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Malaria infectie van apen om parasieten te verkrijgen voor studies die geneesmiddelen en vaccin ontwikkeling ondersteunen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC 10.2.g
- Postadres 10.2.g
- E-mailadres 10.2.e

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 818 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
- 

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam 10.2.e

Functie 10.2.g

Plaats Rijswijk

Datum 07 - 06 - 2018

Handtekening 10.2.e en 10.2.g



5886

1 1 JUN 2018

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

10.2.g

10.2.e

Date June 8, 2018

Our re:

Your letter



10.2.e



Subject aanvraag projectvergunning dierproeven administratieve gegevens

Geachte heer/mevrouw,

Hierbij stuur ik u de aanvraag projectvergunning dierproeven, administratieve gegevens, getiteld:  
" *Malaria infectie van apen om parasieten te verkrijgen voor studies die geneesmiddelen- en vaccin  
ontwikkeling ondersteunen*".

10.2.e en 10.2.g

Bijlagen: 1

10.2.g





## Format

### Niet-technische samenvatting

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project Malaria infectie van apen om parasieten te verkrijgen voor studies die geneesmiddelen- en vaccin ontwikkeling ondersteunen
- 1.2 Looptijd van het project 1 augustus 2018- 30 juli 2023
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) malaria, parasiet stadia, resusaap

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Malaria is één van de belangrijkste infectieziekten ter wereld, met desastreuze invloed op de sociaal-economische ontwikkeling van de getroffen landen. De ziekte veroorzaakt wereldwijd tot 500.000 doden per jaar en vele miljoenen worden ziek. Er bestaan geen effectieve vaccins en malariaparasieten worden in hoog tempo resistent tegen geneesmiddelen; onderzoek naar vaccins en nieuwe geneesmiddelen is dan ook noodzakelijk. Het doel van dit onderzoek is het verkrijgen van parasieten voor parasitologische, biochemische en moleculaire studies waarmee uiteindelijk nieuwe aangrijpingspunten voor



medicijnen en vaccinkandidaten kunnen worden geïdentificeerd en gevalideerd.

Er zijn 5 malariaparasietsoorten die de mens besmetten, maar de meeste daarvan kunnen alleen heel beperkt in de mens bestudeerd worden, omdat ze niet buiten de mens gekweekt kunnen worden. Een aantal malariaparasieten van apen zijn uitstekende modellen voor de menselijke parasieten. Na infectie kunnen de parasieten uit de besmette aap worden gehaald, ten behoeve van het onderzoek naar nieuwe medicijnen en vaccins. Ook deze parasieten kunnen niet buiten de aap gekweekt worden. Om parasietmateriaal te verkrijgen voor vervolgstudies worden daarom apen besmet met de parasiet.

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?  
De opbrengsten zijn vooral gericht op het vergroten van de kennis van de biologie van de humane parasieten, waar de apen malariavarianten model voor staan. Met deze kennis kunnen we gericht medicijnen en vaccins tegen de menselijke malariavarianten ontwikkelen.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?  
In 5 jaar tijd zullen maximaal 25 resusapen nodig zijn.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?  
Handelingen veroorzaken stress. Dit wordt zoveel mogelijk beperkt door dieren te trainen voor eenvoudige handelingen. Voor complexere handelingen worden dieren verdoofd. Dieren worden mogelijk ziek door malaria besmetting.
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?  
Het ongerief is maximaal matig, in de meeste gevallen (80%) licht.
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?  
De dieren worden genezen van malaria en blijven deel uitmaken van het dierbestand op het instituut. In enkele gevallen (~10%) zullen de dieren geëuthanaseerd worden om weefsel met parasieten te isoleren.

#### 4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**  
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.  
De parasiet ontwikkelingsstadia die nodig zijn voor verder onderzoek kunnen niet *in vitro* gekweekt worden en kunnen alleen verkregen worden uit besmette apen. Een onderdeel van het onderzoek is te proberen de parasieten aan te passen aan *in vitro* groei, waardoor apen niet meer nodig zullen zijn om parasietmateriaal te produceren.
- 4.2 **Vermindering**  
Leg uit hoe kan worden  
Verschillende onderzoeken aan de parasiet zullen worden gecombineerd met

verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

de parasieten uit 1 besmette aap, waardoor niet meer apen met dezelfde parasietstam besmet hoeven te worden. Zo zullen waar nodig tegelijkertijd parasietstocks gemaakt worden, muggen gevoed worden met besmet bloed en DNA/RNA/eiwit gezuiverd worden uit bloedstadiumparasieten voor moleculair/biochemisch onderzoek met de parasieten verkregen uit 1 apeninfectie.

#### 4.3 Verfijning

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

Het onderzoek gebeurt in apen, omdat de apen malariaparasieten uitstekende modellen vormen voor de menselijke malaria varianten, en alleen apen (en mensen) kunnen besmetten. Door langdurige ervaring met het diersmodel zijn de protocollen verfijnd om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden. Het ongerief wordt beperkt door dieren te trainen voor eenvoudige handelingen. 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 malariaverschijnselen in apen zijn gering; de dieren worden vroegtijdig genezen en de gezondheidstoestand van de dieren wordt nauwkeurig geobserveerd.

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

Complexere handelingen worden uitgevoerd onder verdoving. Het gebruik van getrainde dieren voor eenvoudige handelingen vermindert de stress. Tijdens de infectie worden de dieren geobserveerd. Als ziekteverschijnselen optreden worden de dieren genezen.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 50200
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Biomedical Primate Research Centre
- 1.3 Provide the title of the project. Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
  - Translational or applied research
  - Regulatory use or routine production
  - Research into environmental protection in the interest of human or
  - Research aimed at preserving the species subjected to procedures
  - Higher education or training
  - Forensic enquiries
  - Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

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

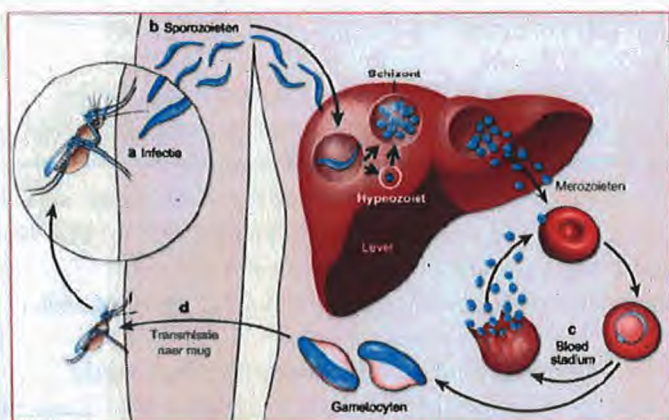
deaths are a consequence of a series of complications termed severe malaria and of treatment failure. The high mortality combined with an even higher burden of disease, known as morbidity is hampering the socio-economic development of developing countries. Yearly up to 500,000 people die of malaria, the majority of which are children younger than 5 years of age, pregnant women, the elderly and immune-compromised adults. Overall 3.2 billion people in 95 countries are at risk of malaria infection. A vaccine able to provide sterile protection from infection does not exist and the parasite is becoming resistant to drugs very quickly leading to an increasing level of treatment failure. Given the seriousness of the threat that malaria poses, effective vaccines and drugs are urgently needed (1).

Malaria is caused by parasites of the genus *Plasmodium*, which are transmitted to their vertebrate host through *Anopheles* mosquitoes. After a mosquito bite, parasite stages known as sporozoites travel first to the liver where they multiply for six to ten days (figure 1). The liver phase of the infection is asymptomatic. When the infected liver cells burst, around 10,000-40,000 new parasites are released into the blood stream, which infect red blood cells and can cyclically multiply up to  $\pm 10$ -fold. Some malaria parasite species, aside from producing developing liver forms, give also rise to sleeping liver forms, which do not develop in a first instance, but stay quiescent in the liver for a variable amount of time before reactivation. Such liver forms are known as hypnozoites. The blood stage of the malaria infection is responsible for the disease symptoms. During this phase of infection also sexual blood stages of the parasite are formed, which, after ingestion by the mosquito when taking a blood meal, fertilize and ultimately form sporozoites in the salivary glands, ready for infection of the next person.

There are five *Plasmodium* species that infect humans: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi* (a zoonosis). Of these species *P. falciparum* and *P. vivax* are the most widespread. *P. falciparum* is responsible for the high malaria mortality, while *P. vivax* is responsible for the high malaria burden of disease (morbidity). Two human parasites (*P. vivax*, *P. ovale*) are able to form sleeping liver stages, which can reactivate weeks, months or even years after the primary infection, giving rise to malaria anew, without exposure to a new infection. On the other hand, *P. malariae* and *P. knowlesi* infections in humans do not give rise to sleeping liver stages but can be responsible for extremely serious complications leading to death. *P. falciparum* has been researched extensively because it is the most serious form of human malaria and the blood stages of this parasite can be cultured in vitro, giving easy access to parasite material. Research into *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi* has been limited, because in disease terms they are considered as lesser important and because the first 3 cannot be cultured in vitro, limiting access to parasite material for studies. However, as successes in the fight against *P. falciparum* resulted in a decline in the incidence of *P. falciparum* malaria, this notable accomplishment went hand in hand with an increase in the incidence of other human malarias, thus threatening the prospects of malaria eradication (2). If malaria eradication is to be achieved, it is therefore of paramount importance to enhance our research capacity and understanding of *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi* in order to tackle them through specific therapeutic strategies (drugs and vaccines).

*Plasmodium* parasites have a narrow host range; most *Plasmodium* species infect only a specific vertebrate host (e.g. birds, reptiles, rodents, monkeys or humans). While most *Plasmodium* parasite-host combinations are generally very specific, most non-human primate (NHP) malarias infect also humans and some are important zoonoses. *P. knowlesi* and *P. cynomolgi* infect NHP. As discussed, *P. knowlesi* is a zoonotic infection for humans; *P. cynomolgi* – a parasite also able to infect humans – is the closest relative of the human malaria parasite *P. vivax*. Thus, *P. knowlesi* and *P. cynomolgi* infections in NHP are excellent models for *P. knowlesi* and *P. vivax* infections in humans. Other macaque malaria models to assist in drug/vaccine development include: *P. coatneyi*, *P. fragile*, *P. simiovale* and *P. fieldi*, models for the human malarias *P. falciparum* (Pco; Pfr) and *P. vivax/P. ovale* (Psi; Pfi), respectively. Recently, infection models for *P. falciparum* in humans have been developed, especially for evaluating novel vaccine approaches in humans. Such studies require very early treatment of blood stage parasites to avoid disease in the volunteers. While this is useful to study early vaccine effects in humans, late protective effects cannot be

assessed and harvesting sufficient blood stage parasites for biochemical studies is not feasible. For such studies NHP models remain important.



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

An *in vitro* culture system is available for the human parasite *P. knowlesi*. However, the study of other NHP parasites as models in vaccine and drug development for the human malaras requires *in vivo* NHP infections to produce parasite material for further studies, as there are no blood stage culture systems available for NHP malaria parasites. Thus, to obtain parasite material for studies on any parasite other than *P. knowlesi*, NHPs need to be infected *in vivo*. For *P. knowlesi* we also still need (limited) monkey infections, e.g. to re-adapt parasite populations to the *in vivo* situation in order to measure parasite growth kinetics *in vivo* and to provide parasite stages that can be transmitted to mosquitoes. Previous attempts to transmit our *in vitro* adapted *P. knowlesi* parasites without first passaging them through a NHP failed. Studies on *P. cynomolgi* described in this application will be limited to those that are not covered by project permit AVD5020020172664, which was specifically focused solely on the development of drugs against the liver stages of the parasite and not on the study of all aspects of its biology including e.g. blood stages, the adaptation of human and/or monkey field strains of *P. cynomolgi* to growth in our macaques, the study of their growth characteristics etc.

At the institute where studies of NHP malaria parasites will be carried out there is a lot of experience in working with NHP malaria parasites in non-human primates to investigate mechanisms that can be used as targets for innovative anti-malaria therapies. Furthermore, there is a great deal of experience in using 'omics' technologies, bio-imaging and systems analysis to uncover and validate gene targets for drug and vaccine approaches as well as combinatorial biomarkers.

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

- The production of sporozoites for liver cell infection including *in vitro* drug assays, 'omics' and systems biology studies on *in vitro* liver stage cultures. Donor monkeys are required to obtain blood stage parasites, which will be fed *ex vivo* to mosquitoes.
- 'Omics' studies on blood stage parasites obtained from donor monkeys.
- *In vivo* re-adaptation of the *P. knowlesi* parasite (and possibly other NHP malaria parasites that have been adapted to *in vitro* culture in the future) to the *in vivo* situation to study parasite growth kinetics *in vivo*;
- Adaptation of NHP parasite field strains to growth in rhesus macaques to determine, among others, growth characteristics, transmission parameters, drug sensitivity;
- Provision of viable parasites as starting material for adaptation of NHP parasites to long-term *in vitro* cultures and to make parasite stocks for future use;
- Direct harvesting of liver stage parasites from *in vivo*-infected livers for comparative 'omics studies

Two development stages of the parasite are used in this research: These are a) **sporozoites** that are obtained by feeding mosquitoes on malaria infected monkey blood and b) **blood-stage parasites** that are obtained directly from the infected monkey.

**a) Production of sporozoites.** Sporozoites are used in a number of different experiments:

1. Drug profiling for selected drug candidates on *in vitro*-cultured parasite liver stages
2. The *in vitro* study of the liver stage biology of different NHP parasites and the isolation of large amounts of liver stage parasites for among others 'omics studies.
3. Making blood stage parasite stocks. Malaria parasites that are adapted to *in vitro* cultures long-term lose the ability to infect mosquitoes and thus to make sporozoites. This is circumvented by making parasite stocks from blood stages resulting from a sporozoite infection.
4. Infection of rhesus monkeys, to study *in vivo* growth characteristics in liver and blood.

Examples include but are not limited to: the characterization of the numbers of hypnozoites a new parasite strain forms *in vitro* and assessment of its drug sensitivity with the aim to optimize the *in vitro* liver assay by using a strain that forms more hypnozoites. Scaling up such an optimized assay to a 384-well format would be easier and would allow for the testing of more drugs from a single monkey infection. Furthermore, comparisons of drug sensitivity between strains, which would be needed and allow for us to start developing new hits.

**b) Production of blood-stage parasites.** Blood-stage parasites are used for:

1. Making blood stage parasite stocks directly from the blood stage infection for later use
2. Studying *in vivo* growth- and transmission characteristics
3. The purification of blood stage parasites for 'omics and *ex vivo* drug/growth studies, and *in vitro* culture adaptation

Examples include but are not limited to: the characterization of the *in vivo* growth in non-human primates of human *Pk* blood stages parasites, where genome sequencing will be conducted if aberrant growth characteristics are observed as this may lead to the identification of new vaccine candidates.

### 3.2 Purpose

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

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

**Project objective:** The overall objective of this project is the study of NHP parasites as models for human malarial in the context of drug and vaccine development. As parasite drug resistance against the most commonly used antimalarial drugs is continuously increasing and we do not have an effective malaria vaccine yet, we urgently need to identify and validate new drug targets and vaccine candidates. This requires a better understanding of the biology of the malaria parasites. In this context, it is important to note that about 70% of the parasite genome features conserved hypothetical proteins that have not yet been attributed a function to and which are unique to malaria parasites. State of the art biochemical, molecular and 'omics technologies will be used to dissect parasite vulnerabilities with the aim to target these vulnerabilities with new therapeutic approaches e.g. genes involved in parasite specific pathways that can be targeted without negative effects for the host; essential non-housekeeping, parasite specific genes active in all parasite stages, which could be targeted by one single drug; hypnozoite metabolic markers which will allow us to detect and selectively treat individuals who have developed hypnozoites thus optimizing the use of drugs with potentially severe adverse effects; genome sequencing of human *P.*

*knowlesi* parasites showing differential blood stage growth characteristics in non-human primates to identify the genes involved, which may be good vaccine candidates; genes involved in the ability of the parasites to give rise to more/less hypnozoites that may be key to the hypnozoites development process thus being good drug targets. In this context, different aspects of NHP parasites will be investigated: Studies of blood- and liver stages of NHP parasites aimed at the identification of genes, proteins, metabolic pathways and the regulation thereof will be carried out in order to identify and validate new drug targets and vaccine candidates. For these studies we need parasite material from the different life-cycle stages, which cannot be obtained through *in vitro* culture and are thus derived from monkey infections.

Feasibility (why this objectives are achievable): At this moment, the institute at which this research is carried out is the only one in Europe with routine experience in the study of NHP malaria parasites. Particularly important for such studies is the institute's unique combination of experience in the study of NHP malaria parasites in non-human primates (6), 'omics technologies and systems analysis (7). With this unique set of experiences and knowledge gained through years of work in the field of malaria, the feasibility of the proposed project can be considered very high. As discussed above, 'omics technologies will be used for a number of studies into the biology of NHP parasites. It is thus also important to mention that in-depth sequenced genomes (4) of NHP parasites, which are a prerequisite for the application of 'omics technologies such as transcriptomics and proteomics to NHP parasites, are publically available.

#### Referenties

1. WHO, The Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030, January 2016
2. William et al., PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(1):e2026.
3. Thomas et al., Acta Trop. 2016;160:35-8
4. Pasini et al., Wellcome Open Res. 2017;2:42; Pain et al., Nature. 2008;455(7214):799-803
5. Zeeman et al., Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(3):1586-95; Zeeman et al., Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(5):2858-63
6. Pasini et al., Parasitology. 2016 Dec 12:1-15; Shaw-Saliba et al., PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(7):e0004870; Hempel et al., Trends Mol Med. 2016; 22(6):453-7; Fatih et al., Malar J. 2013; 12:425
7. Pasini et al., Blood. 2006;108(3):791-801; Pasini et al., Mol Cell Proteomics. 2008;7(7):1317-30; Pasini et al., Blood Transfus. 2010; Suppl 3:s126-39; Pasini et al., Mol Cell Proteomics. 2013;12(2):426-48, Fonager et al., J Exp Med. 2012 Jan 16;209(1):93-107

### 3.3 Relevance

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

Malaria is one of the most important human infectious diseases. Yearly around 500,000 people die of malaria and overall 3,2 billion people in 95 countries are at risk of malaria infection. There are five *Plasmodium* species that infect humans: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi* (a zoonosis). In the absence of working vaccines for any of these species and knowing that drug resistance develops very fast, there is an urgent need to identify new drug and vaccine targets for novel treatment development, to ultimately eliminate malaria. As described under 3.1, we use excellent NHP malaria models for the human malaras to assist in this urgent need.

Malaria eradication is still a primary goal of the international community as it would have a tremendous positive socio-economic impact on the populations living in malaria endemic areas. The study of the biology of NHP parasites, which are considered good models for the negeleted human malaria parasites, *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale*, will further this goal as it will provide therapeutic avenues for the treatment of these parasites, which have unique characteristics as described in 3.1. In this context, it is

important to note that while the sustained efforts in the fight against *P. falciparum* resulted in a decline in the incidence of *P. falciparum* malaria, this positive development went hand in hand with an increase in the incidence of the neglected human malarias (*P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*) and the zoonosis *P. knowlesi*, thus threatening the prospects of malaria eradication.

One of the reasons that has led the scientific community to neglect *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale* malaria parasites, is the inability to adapt these parasites species to long-term *in vitro* growth despite attempts being made for over 50 years. One aim of this application is to attempt to adapt the above-mentioned NHP parasites, which are considered good models for *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale*, to long-term *in vitro* blood stage cultures, thus reducing the need to use animals to study parasite vulnerabilities and validate drug targets in the future, while making it possible to increase our study capabilities vis-à-vis of the neglected human malaria parasites. In this context, particular efforts will be made to culture-adapt strains while retaining their ability to be transmitted to mosquitoes. This has historically been a scientific challenge as most Plasmodium strains lose their ability to be transmitted after being adapted to long-term *in vitro* culturing.

### 3.4 Research strategy

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

The project consists of a single type of animal procedure: malaria infection of rhesus macaques with blood- or sporozoite stages of different NHP-parasite species. Growth- and transmission characteristics will be studied and parasites will be harvested from infected monkeys to perform 'omics' and *ex vivo* drug/growth studies, studies of liver stage biology/drug sensitivity, and to make parasite stocks for future use.

Furthermore, attempts to adapt NHP parasites to *in vitro* cultures will be carried out. At the end of the *in vivo* studies, monkeys will be cured from malaria using standard anti-malarials. As the animal infections are mostly aimed at providing parasite material for subsequent studies, no phasing is required.

#### 3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

This project has a single component in terms of the type of animal experiment: **malaria infection of rhesus macaques (attachment 1)**. In this attachment, it is described how rhesus macaques are infected with blood-stages or sporozoites of different NHP-malaria parasite species. Growth characteristics are monitored. When the parasitemia is high enough, malaria mosquitoes are fed *ex vivo* on the infected blood to obtain sporozoites to perform liver stage studies and/or blood stage parasites are harvested to perform the studies mentioned above.

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

Our approach will be incremental as we will use the monkey infections to provide parasites for *in vitro* biochemical, molecular and 'omics' studies, for the attempts to set up *in vitro* cultures and to study the *in vivo* growth and transmission characteristics of the NHP model parasites both derived from long-term stocks and recently isolated from human field infections. In most cases, only one monkey will be used at any given time for infection with blood stages or sporozoites of a particular malaria parasite. In some cases, e.g. when a parasite is growing poorly in the infected monkey, a second monkey may need to be infected with blood from the first infected monkey. When growth characteristics following sporozoite infection are being explored, two monkeys may be used at the same time for sporozoite infection to get a better view on subsequent blood stage parasitemia development. Go-no go decisions to repeat an infection with the same NHP malaria parasite are, e.g. that an *ex vivo* drug sensitivity profile needs to be confirmed, or failed the first time, or when not enough parasites (blood stages or mosquito stages) could be harvested for all planned biological and biochemical analyses. Many infections are not inter-related, though, but arise from specific new research questions for which new parasite material is needed, or from a practical question, like we ran out of parasite stocks and need to prepare new ones.



3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Malaria infection of rhesus macaques
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200				
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre				
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	<table><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Malaria infection of Rhesus monkeys</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Malaria infection of Rhesus monkeys
Serial number	Type of animal procedure				
1	Malaria infection of Rhesus monkeys				

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

As different NHP-parasites, with the exception of a few *P. knowlesi* strains, cannot be cultured *in vitro*, it is necessary to infect rhesus monkeys to obtain the living parasites for our studies. Two development stages of the parasite are used in this research: These are a) **sporozoites** that are obtained by feeding mosquitoes on malaria infected monkey blood and b) **blood-stage parasites** that are obtained directly from the infected monkey.

a) **Production of sporozoites.** Sporozoites are used in a number of different experiments:

1. Drug profiling for selected drug candidates on *in vitro*-cultured parasite liver stages
2. The *in vitro* study of the liver stage biology of different NHP parasites and the isolation of large amounts of liver stage parasites for among others 'omics studies.
3. Making blood stage parasite stocks. Malaria parasites that are adapted to *in vitro* cultures long-term lose the ability to infect mosquitoes and thus to make sporozoites. This is circumvented by making parasite stocks from blood stages resulting from a sporozoite infection.
4. Infection of rhesus monkeys, to study growth characteristics in liver and blood.

Examples of the type of studies that are envisaged under a) include among others: the characterization of the numbers of hypnozoites a new parasite strain forms *in vitro* and the assessment of its drug sensitivity with the aim to optimize the *in vitro* liver assay by using a strain that forms more hypnozoites. Scaling up of such an optimized assay to a 384-well format would be easier and would allow for the testing of more drugs from a single monkey infection; the comparisons of drug sensitivity

between strains, which would allow for us to start developing new hits.

**b) Production of blood-stage parasites.** Blood-stage parasites are used for:

1. Making blood stage parasite stocks directly from the blood stage infection for later use
2. Studying *in vivo* growth- and transmission characteristics
3. The purification of blood stage parasites for 'omics and *ex vivo* drug/growth studies, and *in vitro* culture adaptation

Examples of the type of studies that are envisaged under b) include among others: the characterization of the *in vivo* growth in non-human primates of human *Pk* blood stages parasites, where genome sequencing will be conducted if aberrant growth characteristics are observed as this may lead to the identification of new vaccine candidates.

In all these experiments, the work protocols are as follows. After an i.v. injection (under sedation) with blood-stage parasites (coming from a frozen stock or freshly isolated from another infected monkey) or with sporozoites, the development of blood-stage parasitemia is followed regularly by blood smears obtained from a drop of blood taken by performing a thigh prick on an infected monkey using a needle-pen. In general, bleeding will occur at peak parasitemia and when the parasites are in the correct developmental stage (primary outcome parameter) in order to feed malaria mosquitoes *ex vivo* to produce sporozoites, to make stocks or to isolate blood stage parasites (bleedings involving a large volume of blood will be done under sedation) for 'omics studies.

In most of the above-described malaria infections the monkeys will be radically cured with currently available antimalarial drugs at the end of the experiment. Only in a limited amount of cases in which parasites need to be harvested directly from the liver (e.g. for 'omics comparison with parasites grown in *in vitro* liver cultures), the animal will be sacrificed at the end of the experiment.

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

Parasite infections are performed through a direct intravenous injection under sedation. Small blood draws are carried out through a needle prick in the thigh of an infected animal. Animals are trained to cooperate with these procedures through positive reinforcement training. Large bleedings are always performed under sedation. Treatment of blood stage malaria is performed through i.m. injections with antimalarial drugs. If a monkey is infected with sporozoites of a NHP malaria species that forms hypnozoites, the monkey will receive the standard radical treatment comprising anti-blood stage drugs (i.m. injections) and specific anti-liver stage drugs (oral administration). A typical infection lasts for ca. 2 weeks, before the parasitemia is high enough to draw infected blood for subsequent experiments.

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

The estimated number of animals that will be used are based on the number of experiments each year that will require blood stage parasites or sporozoites. The number of monkeys will be strictly limited to the number necessary to perform the experiments. The most important parameter is the number of viable parasites that can be harvested per animal. As in these experiments groups of animals are not compared to one another, a power analysis is not applicable.

#### **B. The animals**

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

*Macaca mulatta* (young and old; female and male). Estimated number of animals based on the current (last 5 years) use of animals for parasite production for *in vitro* studies: ca. 25 animals over a total of 5 years:

- 25 animals to be used for the production of sporozoites and blood stage parasites in line with the experiments outlined under A. 15 animals will be used to produce sporozoites for the

purposes of 1) performing assays on *in vitro*-cultured parasite liver stages to evaluate new drugs; 2) performing *in vitro* studies of the liver stage biology of different NHP parasites and isolating large amounts of liver stage parasites for among others 'omics studies to identify new drug targets and vaccine candidates and 3) to study parasite growth characteristics in liver and blood aimed at better understanding the biology of the parasites and thus dissect their vulnerabilities. The remaining 10 animals will be used for the production of blood-stage parasites for the purpose of performing studies of *in vivo* growth- and transmission characteristics and purification of blood stage parasites for 'omics and *ex vivo* drug/growth studies, and *in vitro* culture adaptation. Blood stage parasite stocks will be made from all these animals without infecting additional animals for this specific purpose. In general, the parasites derived from one animal will be used to answer multiple biological questions at any given infection using different biochemical, molecular and 'omics technologies. As an example, we may infect an NHP with a particular *P. cynomolgi* strain to feed mosquitoes. At the same time we may harvest blood stage parasites for proteomic analysis and to prepare parasite lysates for western blots. The sporozoites from the mosquitoes will be used for *in vitro* liver stage cultures in drug studies, two new NHP may be infected with sporozoites to make freshly transmitted blood stage stocks and to characterize the relapse pattern of this parasite strain.

The rhesus monkey is the natural or experimental host of a number of NHP-malaria parasite species, whose blood stages cannot be cultured *in vitro*. The NHP-malaria parasites selected for this application are excellent models for human malaria parasites and grow in general very well in all sorts (young and old; female and male) of rhesus monkeys of Indian origin.

#### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Animals to be used in these experiments, may have been used in other studies. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal frameworks described in art. 1<sup>e</sup> of the law on animal testing. In the case of an earlier use in malaria studies, a minimum of 6 months must have elapsed before a new malaria infection to avoid issues that may derive from the developing immunity towards the malaria parasites.

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

No

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

#### D. Replacement, reduction, refinement

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

**Replacement.** Due to the limited host range of NHP malaria parasite species, only non-human primates can be used in this research. NHP malaria parasites are phylogenetically most closely related to human malaria parasites and thus the most relevant models for them. This relatedness is crucial when it comes to uncovering and validating relevant targets for the development of vaccines and new drugs that will be used as therapies to combat human malarias. Due to ethical restrictions, studies in human volunteers are not used to uncover or validate new drug targets and vaccine candidates. Human trials are only used for follow up purposes to determine whether candidate drugs and vaccines are safe and effective in humans after such candidate drugs and vaccines have been down-selected and validated through *in vitro* and animal experiments. The focus of our parasite studies will be on *P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. coatneyi*, *P. fragile*, *P. brasilianum*, *P. simiovale* and *P. fieldi* parasites. *P. knowlesi* is an important human parasite (zoonosis) in

South East Asia, while the other NHP parasites are good models for the human malarial *P. falciparum* (*P. coatneyi*, *P. fragile*), *P. vivax* (*P. cynomolgi*), *P. malariae* (*P. brasilianum*) and *P. ovale* (*P. simiovale*; *P. fieldi*), respectively. Currently, there are no blood stage culture systems available for NHP malaria parasites, except for *P. knowlesi*. Human malaria parasites except for *P. knowlesi* and *P. falciparum* can also not be cultured *in vitro*. Thus, to obtain parasite material for studies on any of the NHP parasites other than *P. knowlesi*, NHPs need to be used. One aim of this application is to attempt to set up blood stage cultures for the NHP parasites mentioned above, thus reducing the need to use animals to study parasite vulnerabilities and validate drug targets in the future. For *P. knowlesi* we still need limited monkey infections, to re-adapt the parasite to the *in vivo* situation in order to measure parasite growth kinetics *in vivo*, to adapt and study the characteristics of human and animal-derived field strains, to study (*in vitro* manipulated) parasites *in vivo* and to provide parasite stages that can be transmitted to mosquitoes. Previous attempts to transmit our *in vitro* adapted parasites without first passaging them through a NHP failed. At the moment, NHP cannot be replaced as these NHP parasites cannot be cultured *in vitro* yet. The transmission of *in vitro* adapted parasites without first passaging them through NHP remains an aim of this application, as the project as a whole is aimed at replacing NHPs by adapting NHP parasites to *in vitro* cultures. In this context, particular efforts will be made to culture-adapt strains while retaining their ability to be transmitted to mosquitoes. This has historically been a challenge as most Plasmodium strains lose their ability to be transmitted after being adapted to long-term *in vitro* culturing.

**Reduction.** The donor monkeys are used efficiently in that in transmission experiments, we are feeding the maximum number of mosquitoes, which we can handle in each experiment (1000-1500), to yield large numbers of sporozoites for further studies. Efficient use will be made of infected blood harvested from donor monkeys (e.g. making parasite stocks, studying blood stage growth characteristics and feeding mosquitoes), thus reducing the number of monkeys needed for infection of a specific NHP parasite strain.

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

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

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

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

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

Not applicable. This is not legally required research.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

### G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Discomfort by recovery from the sedation.

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

Explain why these effects may emerge.

Awakening from sedation can cause disorientation and nausea

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

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

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

In general, the symptoms of malaria in most NHP species are very mild at low parasitemia and are therefore hardly observed. If animals develop more severe symptoms, the parasitemia is immediately determined and if the parasitemia appears to be exceptionally high (>7%), the animals are immediately cured with chloroquine injections. Very mild malaria symptoms disappear spontaneously after a few hours, when the red blood cell rupture is over.

#### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

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

Indicate the likely incidence.

<1%

#### K. Classification of severity of procedures

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

Mild discomfort for most parasite donors (ca. 80% of the animals); moderate discomfort, if many pricks in the upper leg are required to study *in vivo* growth, or the malaria symptoms are more serious than expected (ca. 20% of the animals).

### End of experiment

#### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

In 20% of cases it will be necessary to obtain parasites directly from the liver (e.g. for 'omics comparison with *in vitro* grown parasite liver stages). The vast majority of animals will be cured and return to the experimental stock.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD5020020185886  
**Bijlagen**  
2

Datum 11 juni 2018  
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 juni 2018. Het gaat om uw project "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020185886. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

#### **Wacht met de uitvoering van uw project**

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

#### **Factuur**

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



**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**

11 juni 2018

**Aanvraagnummer:**

AVD5020020185886

**Datum:**  
11 juni 2018  
**Aanvraagnummer:**  
AVD5020020185886

### Gegevens aanvrager

#### Uw gegevens

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

#### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

### 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 augustus 2018

Geplande einddatum: 31 juli 2023

Titel project: Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development

Titel niet-technische samenvatting: Malaria infectie van apen om parasieten te verkrijgen voor studies die geneesmiddelen en vaccin ontwikkeling ondersteunen

Naam DEC: 10.2.g

Postadres DEC:

E-mailadres DEC: 10.2.e

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.285,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting**Ondertekening**

Naam: 10.2.e

Functie: 10.2.g

Plaats: Rijswijk

Datum: 7 juni 2018

**Datum:**

11 juni 2018

**Aanvraagnummer:**

AVD5020020185886



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre

10.2.e

Postbus 3306

2288 GJ RIJSWIJK

10.2.g

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD5020020185886

**Bijlagen**

2

Datum 11 juni 2018

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 11 juni 2018

Vervaldatum: 11 juli 2018

Factuurnummer: 185886

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5020020185886	€ 1.285,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

## 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: AVD5020020185886
2. Titel van het project: Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development.
3. Titel van de NTS: Malaria infectie van apen om parasieten te verkrijgen voor studies die geneesmiddelen- en vaccin ontwikkeling ondersteunen.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: 10.2.g
  - telefoonnummer contactpersoon: 010.2.e
  - e-mailadres contactpersoon: 10.2.e
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 11-06-2018
  - aanvraag compleet: 11-06-2018
  - in vergadering besproken: 18-06-2018
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 19-06-2018 tot 20-06-2018
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 20-06-2018
  - advies aan CCD: 26-06-2018
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.  
De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend bij de CCD.

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

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

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Gestelde vraag / vragen
  - Verstrek(e) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 19-06-2018
  - Gestelde vraag/vragen: Een paar tekstuele wijzingen
  - Datum antwoord: 20-06-2018
  - Verstrek(e) antwoord(en): De suggestie zijn doorgevoerd
  - De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag (alleen NTS)
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.
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Er waren geen conflicterende belangen bij de beoordeling van dit voorstel.

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

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het voorgestelde onderzoek betreft het verkrijgen van malaria parasieten in diverse stadia van ontwikkeling voor gebruik in *in vitro* experimenten en voor het verkrijgen van parasieten stocks voor vervolg *in vivo* experimenten. Aangezien deze parasieten niet *in vitro* gekweekt kunnen worden, worden ze verkregen uit een voor dit doel geïnfecteerd dier. Het betreft één type experiment; malaria infectie van resus apen. Het doel van dit experiment, namelijk het verkrijgen

van malaria parasieten, is een voorwaarde om het doel van het project, *in vitro* screening van anti-malaria drugs en het bestuderen van de eigenschappen van de parasiet, te bereiken. 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 op basis van ervaring van de afgelopen jaren. De klinische eindpunten zijn duidelijk gedefinieerd.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorieën, te weten 'fundamenteel onderzoek' en 'translationeel of toegepast onderzoek', sluiten aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag wordt met behulp van malaria parasieten, verkregen uit geïnfecteerde dieren, de fysiologie en groei-eigenschappen van de parasiet bestudeerd. Hierdoor worden nieuwe wetenschappelijke inzichten verkregen over de malaria parasiet. Deze kennis kan mogelijk worden toegepast bij de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins tegen malaria. Daarnaast zal met behulp van deze parasieten ook de werkzaamheid van diverse nieuwe medicijnen getest worden door middel van *in vitro* testen.

#### *Belangen en waarden*

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Het directe doel van het project is het verkrijgen van malaria parasieten in diverse stadia van ontwikkeling voor gebruik in *in vitro* experimenten en voor het verkrijgen van parasieten stocks voor vervolg *in vivo* experimenten. Het uiteindelijke doel is deels om een beter begrip te krijgen van de fysiologie van de parasiet om zodoende nieuwe targets te vinden voor ontwikkeling van toekomstige anti-malaria medicijnen en vaccins. Anderzijds worden de parasieten gebruikt in reeds ontwikkelde *in vitro* testen voor het screenen van een aantal nieuwe kandidaat geneesmiddelen tegen malaria. Momenteel kunnen alleen *P. falciparum* en *P. knowlesi* parasieten volledig *in vitro* gekweekt worden. Hierdoor is de fysiologie van deze parasieten redelijk goed in kaart gebracht. Voor andere malaria parasieten die de mens infecteren geldt dat niet en is aanvullende informatie nodig ten behoeve van ontwikkeling van geneesmiddelen en vaccins. Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*). De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het verkrijgen van meer kennis over de fysiologie en *in vivo* groei-eigenschappen van een aantal bij de mens voorkomende malaria parasieten en het *in vitro* testen van nieuwe medicijnen tegen malaria zijn: het onderzoeksveld, de proefdieren en de te genezen personen.

Voor het onderzoeksveld is het verkrijgen van nieuwe kennis over de fysiologie van de malaria parasiet van groot belang. Deze kennis kan leiden tot selectie van bepaalde genen van de parasiet als mogelijke target voor nieuwe anti-malaria medicijnen en vaccins. Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s).

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

pijn ondervinden.

Voor mensen die besmet raken met malaria is het beschikbaar komen van nieuwe effectieve middelen tegen malaria van groot belang. Voor sommige vormen van malaria is er momenteel maar 1 medicijn beschikbaar. Bovendien is resistentie waargenomen tegen veel van de huidige gebruikte medicijnen. Daarnaast is het beschikbaar komen van een vaccin tegen malaria essentieel voor het beschermen van grote groepen mensen tegen deze parasiet.

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

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn boven iedere twijfel verheven gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's. De onderzoeksgroep heeft vele jaren ervaring met experimentele infectie van diverse apen soorten met diverse vormen van malaria. Tevens heeft de onderzoeker veel ervaring met bestuderen van de biologie van de malaria parasiet, door middel van diverse 'omics' technieken.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. Het in de bijlage beschreven infectie model is reeds vele malen toegepast en zal leiden tot het verkrijgen van de voor verder onderzoek benodigde malaria parasieten. Ook bestaat er reeds veel ervaring met de analyse technieken en *in vitro* kweekmethoden die op de geïsoleerde parasieten zullen worden toegepast. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

#### *Welzijn dieren*

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

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



De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met plasmodium soorten die ofwel identiek zijn aan of die een grote gelijkenis vertonen met plasmodium soorten bij de mens. Plasmodium soorten hebben een beperkte host range en de in de aanvraag beschreven soorten kunnen naast de mens alleen niet humane primaten infecteren. Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Ook gebruik in een eerdere malaria studie vormt, na een rustperiode van 6 maanden, geen belemmering voor hergebruik. Het werkelijke aantal dieren die binnen dit project gebruikt gaan worden zal daardoor lager uitvallen. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III.
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief is op basis van ervaring met malaria infectie studies in niet-humane primaten correct als licht ingeschat voor het merendeel van de studies waarbij malaria infectie van resusapen plaats vindt voor sporozoiet en bloedstadium parasiet productie. In 20% van de gevallen is het ongerief als matig ingeschat indien er vaker bloed afgenomen moet worden om de groeikarakteristieken vast te stellen of indien er meer ernstige malaria symptomen optreden. 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 en daarmee ernstig ongerief optreden. De dieren zijn speciaal voor dit doel gefokt, en zullen als sociaal compatibel duo worden gehuisvest.
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de dieren te infecteren met malaria en door de toediening van geneesmiddelen tegen malaria. Deze aantasting is van voorbijgaande aard voor ~80% van de dieren, deze dieren worden behandeld tegen de infectie. Ongeveer 20% van de dieren zal worden ge-euthanaseerd tijdens het experiment, omdat het nodig is om van die dieren de lever te gebruiken voor verder onderzoek.
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe. Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de kans dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken terecht als laag ingeschat.
14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. In dit project worden malaria parasieten onderzocht die niet volledig *in vitro* zijn te kweken. Daarom blijven geïnfecteerde dieren nodig. Er wordt gedurende het project echter wel gewerkt aan het opzetten van *in vitro* kweeksystemen. Voor het verkrijgen van sporozoieten wordt een *ex vivo* techniek gebruikt waardoor voorkomen wordt dat de apen door de muggen gestoken moeten worden.
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen.

Licht uw beoordeling toe. Het aantal benodigde dieren wordt deels bepaald door de opbrengst aan parasieten per infectie en door de capaciteit in het laboratorium om experimenten met deze parasieten te verrichten. Op basis van het aantal experimenten dat in de afgelopen jaren kan worden afgeleid dat een aantal van 25 dieren over een periode van vijf jaar een realistische inschatting is. 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. Het aantal bloedafnames kan tot een minimum worden beperkt in geval reeds eerder geteste malaria stammen worden gebruikt, aangezien van deze stammen bekend is wanneer de parasieten in het bloed verschijnen. Sedatie wordt toegepast wanneer geïndiceerd. Bij onverwacht grotere welzijnsaantasting dan voorzien zal een humaan eindpunt worden toegepast. 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 kunnen dieren van beide geslachten worden gebruikt.
19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. De meeste dieren zullen in leven blijven aan het einde van het project. Voor de dieren die ge-euthanaseerd worden wordt een passende dodingsmethode gebruikt zoals vermeld in de richtlijn 2010/63/EU.
20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. Hergebruik is mogelijk, ook binnen dit project (mits er na infectie een tussenperiode van 6 maanden in acht wordt genomen). Hergebruik zal plaats vinden binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke criteria ten aanzien van de dierproef.

*NTS*

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

## D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het verkrijgen van nieuwe kennis omtrent de fysiologie en groei-eigenschappen en het verkrijgen van parasietmateriaal van bij de mens voorkomende of sterk verwante malaria parasieten 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 het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de fysiologie en groei karakteristieken van de parasiet, hetgeen mogelijke aangrijpingspunten kan opleveren voor het ontwikkelen van nieuwe medicijnen en vaccins tegen malaria. Aangezien er momenteel nog geen afdoend malaria vaccin beschikbaar is en er resistentie optreedt tegen de huidig beschikbare medicijnen is deze kennis van groot belang.

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

De waarden voor de samenleving zijn deels gelegen in het *in vitro* testen van kandidaat medicijnen tegen malaria en deels in het verkrijgen van kennis, hetgeen kan leiden tot ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins in de toekomst. Daarmee is dit onderzoek van aanmerkelijk belang.

Vele miljoenen mensen lijden aan malaria en dit heeft een grote impact op welzijn en op economische productiviteit. Dit onderzoek kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

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

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

Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat de kennis omtrent de fysiologie van de malaria parasiet die in dit project wordt verkregen uiteindelijk kan bijdragen aan het ontwikkelen van effectieve medicijnen en vaccins tegen malaria

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 reeds zijn toegepast. De onderzoeker en het instituut bezitten de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor het verkrijgen van de benodigde malaria parasieten, 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. 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* analyses zijn deels binnen dit instituut opgezet en reeds eerder toegepast. Dit onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in de resusaap, aangezien alleen deze diersoort gevoelig is voor deze voor de mens relevante vormen van malaria. 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 (met behulp van positieve reinforcement training). 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.
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.



10.2.e

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 16 juli 2018 11:26  
**Aan:** 10.2.e  
**CC:**  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD5020020185886

Geachte 10.2.e

Op 08-06-2018 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development " met aanvraagnummer AVD5020020185886. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

**Onduidelijkheden**

In de NTS spreekt u over 10% van de dieren die gedood worden, in de bijlage dierproeven spreekt u over 20% van de dieren. Gelieve dit consistent te maken.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

**Opsturen binnen veertien dagen**

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

**Wanneer een beslissing**

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

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

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

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

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

Betreeft: AVD5020020185886

"Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development "

18 Juli 2018

Geachte 10.2.e

U heeft verzocht om aanvullende informatie met betrekking tot vergunningaanvraag AVD5020020185886 "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development ". Uw vraag betrof een inconsistentie met betrekking tot het aantal dieren dat gedood zou worden in het kader van het project. In de NTS wordt gesproken over 10% van de dieren die gedood worden terwijl in bijlage dierproeven gesproken wordt over 20%.

Onze excuses voor deze inconsistentie. Zoals vermeld in de bijlage dierproeven moet ook in de NTS staan dat 20% van de dieren gedood wordt. Een herziene NTS is separaat toegestuurd.

Met Vriendelijke Groet, 10.2.e en 10.2.g



## Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 50200
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Biomedical Primate Research Centre
- 1.3 Provide the title of the project. Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
  - Translational or applied research
  - Regulatory use or routine production
  - Research into environmental protection in the interest of human or
  - Research aimed at preserving the species subjected to procedures
  - Higher education or training
  - Forensic enquiries
  - Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

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



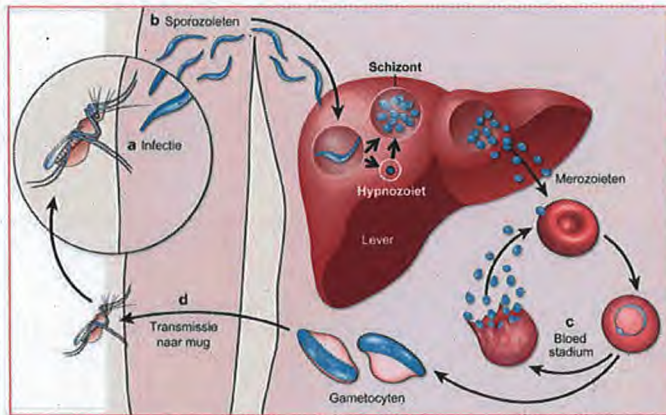
deaths are a consequence of a series of complications termed severe malaria and of treatment failure. The high mortality combined with an even higher burden of disease, known as morbidity is hampering the socio-economic development of developing countries. Yearly up to 500,000 people die of malaria, the majority of which are children younger than 5 years of age, pregnant women, the elderly and immune-compromised adults. Overall 3.2 billion people in 95 countries are at risk of malaria infection. A vaccine able to provide sterile protection from infection does not exist and the parasite is becoming resistant to drugs very quickly leading to an increasing level of treatment failure. Given the seriousness of the threat that malaria poses, effective vaccines and drugs are urgently needed (1).

Malaria is caused by parasites of the genus *Plasmodium*, which are transmitted to their vertebrate host through *Anopheles* mosquitoes. After a mosquito bite, parasite stages known as sporozoites travel first to the liver where they multiply for six to ten days (figure 1). The liver phase of the infection is asymptomatic. When the infected liver cells burst, around 10,000-40,000 new parasites are released into the blood stream, which infect red blood cells and can cyclically multiply up to  $\pm 10$ -fold. Some malaria parasite species, aside from producing developing liver forms, give also rise to sleeping liver forms, which do not develop in a first instance, but stay quiescent in the liver for a variable amount of time before reactivation. Such liver forms are known as hypnozoites. The blood stage of the malaria infection is responsible for the disease symptoms. During this phase of infection also sexual blood stages of the parasite are formed, which, after ingestion by the mosquito when taking a blood meal, fertilize and ultimately form sporozoites in the salivary glands, ready for infection of the next person.

There are five *Plasmodium* species that infect humans: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi* (a zoonosis). Of these species *P. falciparum* and *P. vivax* are the most widespread. *P. falciparum* is responsible for the high malaria mortality, while *P. vivax* is responsible for the high malaria burden of disease (morbidity). Two human parasites (*P. vivax*, *P. ovale*) are able to form sleeping liver stages, which can reactivate weeks, months or even years after the primary infection, giving rise to malaria anew, without exposure to a new infection. On the other hand, *P. malariae* and *P. knowlesi* infections in humans do not give rise to sleeping liver stages but can be responsible for extremely serious complications leading to death. *P. falciparum* has been researched extensively because it is the most serious form of human malaria and the blood stages of this parasite can be cultured in vitro, giving easy access to parasite material. Research into *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi* has been limited, because in disease terms they are considered as lesser important and because the first 3 cannot be cultured in vitro, limiting access to parasite material for studies. However, as successes in the fight against *P. falciparum* resulted in a decline in the incidence of *P. falciparum* malaria, this notable accomplishment went hand in hand with an increase in the incidence of other human malarias, thus threatening the prospects of malaria eradication (2). If malaria eradication is to be achieved, it is therefore of paramount importance to enhance our research capacity and understanding of *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi* in order to tackle them through specific therapeutic strategies (drugs and vaccines).

*Plasmodium* parasites have a narrow host range; most *Plasmodium* species infect only a specific vertebrate host (e.g. birds, reptiles, rodents, monkeys or humans). While most *Plasmodium* parasite-host combinations are generally very specific, most non-human primate (NHP) malarias infect also humans and some are important zoonoses. *P. knowlesi* and *P. cynomolgi* infect NHP. As discussed, *P. knowlesi* is a zoonotic infection for humans; *P. cynomolgi* – a parasite also able to infect humans- is the closest relative of the human malaria parasite *P. vivax*. Thus, *P. knowlesi* and *P. cynomolgi* infections in NHP are excellent models for *P. knowlesi* and *P. vivax* infections in humans. Other macaque malaria models to assist in drug/vaccine development include: *P. coatneyi*, *P. fragile*, *P. simiovale* and *P. fieldi*, models for the human malarias *P. falciparum* (Pco; Pfr) and *P. vivax/P. ovale* (Psi; Pfi), respectively. Recently, infection models for *P. falciparum* in humans have been developed, especially for evaluating novel vaccine approaches in humans. Such studies require very early treatment of blood stage parasites to avoid disease in the volunteers. While this is useful to study early vaccine effects in humans, late protective effects cannot be

assessed and harvesting sufficient blood stage parasites for biochemical studies is not feasible. For such studies NHP models remain important.



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

An *in vitro* culture system is available for the human parasite *P. knowlesi*. However, the study of other NHP parasites as models in vaccine and drug development for the human malaras requires *in vivo* NHP infections to produce parasite material for further studies, as there are no blood stage culture systems available for NHP malaria parasites. Thus, to obtain parasite material for studies on any parasite other than *P. knowlesi*, NHPs need to be infected *in vivo*. For *P. knowlesi* we also still need (limited) monkey infections, e.g. to re-adapt parasite populations to the *in vivo* situation in order to measure parasite growth kinetics *in vivo* and to provide parasite stages that can be transmitted to mosquitoes. Previous attempts to transmit our *in vitro* adapted *P. knowlesi* parasites without first passing them through a NHP failed. Studies on *P. cynomolgi* described in this application will be limited to those that are not covered by project permit AVD5020020172664, which was specifically focused solely on the development of drugs against the liver stages of the parasite and not on the study of all aspects of its biology including e.g. blood stages, the adaptation of human and/or monkey field strains of *P. cynomolgi* to growth in our macaques, the study of their growth characteristics etc.

At the institute where studies of NHP malaria parasites will be carried out there is a lot of experience in working with NHP malaria parasites in non-human primates to investigate mechanisms that can be used as targets for innovative anti-malaria therapies. Furthermore, there is a great deal of experience in using 'omics' technologies, bio-imaging and systems analysis to uncover and validate gene targets for drug and vaccine approaches as well as combinatorial biomarkers.

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

- The production of sporozoites for liver cell infection including *in vitro* drug assays, 'omics' and systems biology studies on *in vitro* liver stage cultures. Donor monkeys are required to obtain blood stage parasites, which will be fed *ex vivo* to mosquitoes.
- 'Omics' studies on blood stage parasites obtained from donor monkeys.
- *In vivo* re-adaptation of the *P. knowlesi* parasite (and possibly other NHP malaria parasites that have been adapted to *in vitro* culture in the future) to the *in vivo* situation to study parasite growth kinetics *in vivo*;
- Adaptation of NHP parasite field strains to growth in rhesus macaques to determine, among others, growth characteristics, transmission parameters, drug sensitivity;
- Provision of viable parasites as starting material for adaptation of NHP parasites to long-term *in vitro* cultures and to make parasite stocks for future use;
- Direct harvesting of liver stage parasites from *in vivo*-infected livers for comparative 'omics studies

Two development stages of the parasite are used in this research: These are a) **sporozoites** that are obtained by feeding mosquitoes on malaria infected monkey blood and b) **blood-stage parasites** that are obtained directly from the infected monkey.

a) **Production of sporozoites.** Sporozoites are used in a number of different experiments:

1. Drug profiling for selected drug candidates on *in vitro*-cultured parasite liver stages
2. The *in vitro* study of the liver stage biology of different NHP parasites and the isolation of large amounts of liver stage parasites for among others 'omics studies.
3. Making blood stage parasite stocks. Malaria parasites that are adapted to *in vitro* cultures long-term lose the ability to infect mosquitoes and thus to make sporozoites. This is circumvented by making parasite stocks from blood stages resulting from a sporozoite infection.
4. Infection of rhesus monkeys, to study *in vivo* growth characteristics in liver and blood.

Examples include but are not limited to: the characterization of the numbers of hypnozoites a new parasite strain forms *in vitro* and assessment of its drug sensitivity with the aim to optimize the *in vitro* liver assay by using a strain that forms more hypnozoites. Scaling up such an optimized assay to a 384-well format would be easier and would allow for the testing of more drugs from a single monkey infection. Furthermore, comparisons of drug sensitivity between strains, which would be needed and allow for us to start developing new hits.

b) **Production of blood-stage parasites.** Blood-stage parasites are used for:

1. Making blood stage parasite stocks directly from the blood stage infection for later use
2. Studying *in vivo* growth- and transmission characteristics
3. The purification of blood stage parasites for 'omics and *ex vivo* drug/growth studies, and *in vitro* culture adaptation

Examples include but are not limited to: the characterization of the *in vivo* growth in non-human primates of human *Pk* blood stages parasites, where genome sequencing will be conducted if aberrant growth characteristics are observed as this may lead to the identification of new vaccine candidates.

### 3.2 Purpose

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

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

**Project objective:** The overall objective of this project is the study of NHP parasites as models for human malarias in the context of drug and vaccine development. As parasite drug resistance against the most commonly used antimalarial drugs is continuously increasing and we do not have an effective malaria vaccine yet, we urgently need to identify and validate new drug targets and vaccine candidates. This requires a better understanding of the biology of the malaria parasites. In this context, it is important to note that about 70% of the parasite genome features conserved hypothetical proteins that have not yet been attributed a function to and which are unique to malaria parasites. State of the art biochemical, molecular and 'omics technologies will be used to dissect parasite vulnerabilities with the aim to target these vulnerabilities with new therapeutic approaches e.g. genes involved in parasite specific pathways that can be targeted without negative effects for the host; essential non-housekeeping, parasite specific genes active in all parasite stages, which could be targeted by one single drug; hypnozoite metabolic markers which will allow us to detect and selectively treat individuals who have developed hypnozoites thus optimizing the use of drugs with potentially severe adverse effects; genome sequencing of human *P.*

*knowlesi* parasites showing differential blood stage growth characteristics in non-human primates to identify the genes involved, which may be good vaccine candidates; genes involved in the ability of the parasites to give rise to more/less hypnozoites that may be key to the hypnozoites development process thus being good drug targets. In this context, different aspects of NHP parasites will be investigated: Studies of blood- and liver stages of NHP parasites aimed at the identification of genes, proteins, metabolic pathways and the regulation thereof will be carried out in order to identify and validate new drug targets and vaccine candidates. For these studies we need parasite material from the different life-cycle stages, which cannot be obtained through *in vitro* culture and are thus derived from monkey infections.

Feasibility (why this objectives are achievable): At this moment, the institute at which this research is carried out is the only one in Europe with routine experience in the study of NHP malaria parasites. Particularly important for such studies is the institute's unique combination of experience in the study of NHP malaria parasites in non-human primates (6), 'omics technologies and systems analysis (7). With this unique set of experiences and knowledge gained through years of work in the field of malaria, the feasibility of the proposed project can be considered very high. As discussed above, 'omics technologies will be used for a number of studies into the biology of NHP parasites. It is thus also important to mention that in-depth sequenced genomes (4) of NHP parasites, which are a prerequisite for the application of 'omics technologies such as transcriptomics and proteomics to NHP parasites, are publically available.

#### Referenties

1. WHO, The Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030, January 2016
2. William et al., PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(1):e2026.
3. Thomas et al., Acta Trop. 2016;160:35-8
4. Pasini et al., Wellcome Open Res. 2017;2:42; Pain et al., Nature. 2008;455(7214):799-803
5. Zeeman et al., Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(3):1586-95; Zeeman et al., Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(5):2858-63
6. Pasini et al., Parasitology. 2016 Dec 12:1-15; Shaw-Saliba et al., PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(7):e0004870; Hempel et al., Trends Mol Med. 2016; 22(6):453-7; Fatih et al., Malar J. 2013; 12:425
7. Pasini et al., Blood. 2006;108(3):791-801; Pasini et al., Mol Cell Proteomics. 2008;7(7):1317-30; Pasini et al., Blood Transfus. 2010; Suppl 3:s126-39; Pasini et al., Mol Cell Proteomics. 2013;12(2):426-48, Fonager et al., J Exp Med. 2012 Jan 16;209(1):93-107

### 3.3 Relevance

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

Malaria is one of the most important human infectious diseases. Yearly around 500,000 people die of malaria and overall 3,2 billion people in 95 countries are at risk of malaria infection. There are five Plasmodium species that infect humans: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi* (a zoonosis). In the absence of working vaccines for any of these species and knowing that drug resistance develops very fast, there is an urgent need to identify new drug and vaccine targets for novel treatment development, to ultimately eliminate malaria. As described under 3.1, we use excellent NHP malaria models for the human malarias to assist in this urgent need.

Malaria eradication is still a primary goal of the international community as it would have a tremendous positive socio-economic impact on the populations living in malaria endemic areas. The study of the biology of NHP parasites, which are considered good models for the neglected human malaria parasites, *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale*, will further this goal as it will provide therapeutic avenues for the treatment of these parasites, which have unique characteristics as described in 3.1. In this context, it is

important to note that while the sustained efforts in the fight against *P. falciparum* resulted in a decline in the incidence of *P. falciparum* malaria, this positive development went hand in hand with an increase in the incidence of the neglected human malarias (*P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*) and the zoonosis *P. knowlesi*, thus threatening the prospects of malaria eradication.

One of the reasons that has led the scientific community to neglect *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale* malaria parasites, is the inability to adapt these parasites species to long-term *in vitro* growth despite attempts being made for over 50 years. One aim of this application is to attempt to adapt the above-mentioned NHP parasites, which are considered good models for *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale*, to long-term *in vitro* blood stage cultures, thus reducing the need to use animals to study parasite vulnerabilities and validate drug targets in the future, while making it possible to increase our study capabilities vis-à-vis of the neglected human malaria parasites. In this context, particular efforts will be made to culture-adapt strains while retaining their ability to be transmitted to mosquitoes. This has historically been a scientific challenge as most Plasmodium strains lose their ability to be transmitted after being adapted to long-term *in vitro* culturing.

### 3.4 Research strategy

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

The project consists of a single type of animal procedure: malaria infection of rhesus macaques with blood- or sporozoite stages of different NHP-parasite species. Growth- and transmission characteristics will be studied and parasites will be harvested from infected monkeys to perform 'omics' and *ex vivo* drug/growth studies, studies of liver stage biology/drug sensitivity, and to make parasite stocks for future use. Furthermore, attempts to adapt NHP parasites to *in vitro* cultures will be carried out. At the end of the *in vivo* studies, monkeys will be cured from malaria using standard anti-malarials. As the animal infections are mostly aimed at providing parasite material for subsequent studies, no phasing is required.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

This project has a single component in terms of the type of animal experiment: **malaria infection of rhesus macaques (attachment 1)**. In this attachment, it is described how rhesus macaques are infected with blood-stages or sporozoites of different NHP-malaria parasite species. Growth characteristics are monitored. When the parasitemia is high enough, malaria mosquitoes are fed *ex vivo* on the infected blood to obtain sporozoites to perform liver stage studies and/or blood stage parasites are harvested to perform the studies mentioned above.

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

Our approach will be incremental as we will use the monkey infections to provide parasites for *in vitro* biochemical, molecular and 'omics studies, for the attempts to set up *in vitro* cultures and to study the *in vivo* growth and transmission characteristics of the NHP model parasites both derived from long-term stocks and recently isolated from human field infections. In most cases, only one monkey will be used at any given time for infection with blood stages or sporozoites of a particular malaria parasite. In some cases, e.g. when a parasite is growing poorly in the infected monkey, a second monkey may need to be infected with blood from the first infected monkey. When growth characteristics following sporozoite infection are being explored, two monkeys may be used at the same time for sporozoite infection to get a better view on subsequent blood stage parasitemia development. Go-no go decisions to repeat an infection with the same NHP malaria parasite are, e.g. that an *ex vivo* drug sensitivity profile needs to be confirmed, or failed the first time, or when not enough parasites (blood stages or mosquito stages) could be harvested for all planned biological and biochemical analyses. Many infections are not inter-related, though, but arise from specific new research questions for which new parasite material is needed, or from a practical question, like we ran out of parasite stocks and need to prepare new ones.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Malaria infection of rhesus macaques
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 50200
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Biomedical Primate Research Centre
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure            |
|---------------|-------------------------------------|
| 1             | Malaria infection of Rhesus monkeys |

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

As different NHP-parasites, with the exception of a few *P. knowlesi* strains, cannot be cultured *in vitro*, it is necessary to infect rhesus monkeys to obtain the living parasites for our studies. Two development stages of the parasite are used in this research: These are a) sporozoites that are obtained by feeding mosquitoes on malaria infected monkey blood and b) blood-stage parasites that are obtained directly from the infected monkey.

a) **Production of sporozoites.** Sporozoites are used in a number of different experiments:

1. Drug profiling for selected drug candidates on *in vitro*-cultured parasite liver stages
2. The *in vitro* study of the liver stage biology of different NHP parasites and the isolation of large amounts of liver stage parasites for among others 'omics studies.
3. Making blood stage parasite stocks. Malaria parasites that are adapted to *in vitro* cultures long-term lose the ability to infect mosquitoes and thus to make sporozoites. This is circumvented by making parasite stocks from blood stages resulting from a sporozoite infection.
4. Infection of rhesus monkeys, to study growth characteristics in liver and blood.

Examples of the type of studies that are envisaged under a) include among others: the characterization of the numbers of hypnozoites a new parasite strain forms *in vitro* and the assessment of its drug sensitivity with the aim to optimize the *in vitro* liver assay by using a strain that forms more hypnozoites. Scaling up of such an optimized assay to a 384-well format would be easier and would allow for the testing of more drugs from a single monkey infection; the comparisons of drug sensitivity

between strains, which would allow for us to start developing new hits.

**b) Production of blood-stage parasites.** Blood-stage parasites are used for:

1. Making blood stage parasite stocks directly from the blood stage infection for later use
2. Studying *in vivo* growth- and transmission characteristics
3. The purification of blood stage parasites for 'omics and *ex vivo* drug/growth studies, and *in vitro* culture adaptation

Examples of the type of studies that are envisaged under b) include among others: the characterization of the *in vivo* growth in non-human primates of human *Pk* blood stages parasites, where genome sequencing will be conducted if aberrant growth characteristics are observed as this may lead to the identification of new vaccine candidates.

In all these experiments, the work protocols are as follows. After an i.v. injection (under sedation) with blood-stage parasites (coming from a frozen stock or freshly isolated from another infected monkey) or with sporozoites, the development of blood-stage parasitemia is followed regularly by blood smears obtained from a drop of blood taken by performing a thigh prick on an infected monkey using a needle-pen. In general, bleeding will occur at peak parasitemia and when the parasites are in the correct developmental stage (primary outcome parameter) in order to feed malaria mosquitoes *ex vivo* to produce sporozoites, to make stocks or to isolate blood stage parasites (bleedings involving a large volume of blood will be done under sedation) for 'omics studies.

In most of the above-described malaria infections the monkeys will be radically cured with currently available antimalarial drugs at the end of the experiment. Only in a limited amount of cases in which parasites need to be harvested directly from the liver (e.g. for 'omics comparison with parasites grown in *in vitro* liver cultures), the animal will be sacrificed at the end of the experiment.

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

Parasite infections are performed through a direct intravenous injection under sedation. Small blood draws are carried out through a needle prick in the thigh of an infected animal. Animals are trained to cooperate with these procedures through positive reinforcement training. Large bleedings are always performed under sedation. Treatment of blood stage malaria is performed through i.m. injections with antimalarial drugs. If a monkey is infected with sporozoites of a NHP malaria species that forms hypnozoites, the monkey will receive the standard radical treatment comprising anti-blood stage drugs (i.m. injections) and specific anti-liver stage drugs (oral administration). A typical infection lasts for ca. 2 weeks, before the parasitemia is high enough to draw infected blood for subsequent experiments.

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

The estimated number of animals that will be used are based on the number of experiments each year that will require blood stage parasites or sporozoites. The number of monkeys will be strictly limited to the number necessary to perform the experiments. The most important parameter is the number of viable parasites that can be harvested per animal. As in these experiments groups of animals are not compared to one another, a power analysis is not applicable.

## **B. The animals**

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

*Macaca mulatta* (young and old; female and male). Estimated number of animals based on the current (last 5 years) use of animals for parasite production for *in vitro* studies: ca. 25 animals over a total of 5 years:

- 25 animals to be used for the production of sporozoites and blood stage parasites in line with the experiments outlined under A. 15 animals will be used to produce sporozoites for the



purposes of 1) performing assays on *in vitro*-cultured parasite liver stages to evaluate new drugs; 2) performing *in vitro* studies of the liver stage biology of different NHP parasites and isolating large amounts of liver stage parasites for among others 'omics studies to identify new drug targets and vaccine candidates and 3) to study parasite growth characteristics in liver and blood aimed at better understanding the biology of the parasites and thus dissect their vulnerabilities. The remaining 10 animals will be used for the production of blood-stage parasites for the purpose of performing studies of *in vivo* growth- and transmission characteristics and purification of blood stage parasites for 'omics and *ex vivo* drug/growth studies, and *in vitro* culture adaptation. Blood stage parasite stocks will be made from all these animals without infecting additional animals for this specific purpose. In general, the parasites derived from one animal will be used to answer multiple biological questions at any given infection using different biochemical, molecular and 'omics technologies. As an example, we may infect an NHP with a particular *P. cynomolgi* strain to feed mosquitoes. At the same time we may harvest blood stage parasites for proteomic analysis and to prepare parasite lysates for western blots. The sporozoites from the mosquitoes will be used for *in vitro* liver stage cultures in drug studies, two new NHP may be infected with sporozoites to make freshly transmitted blood stage stocks and to characterize the relapse pattern of this parasite strain.

The rhesus monkey is the natural or experimental host of a number of NHP-malaria parasite species, whose blood stages cannot be cultured *in vitro*. The NHP-malaria parasites selected for this application are excellent models for human malaria parasites and grow in general very well in all sorts (young and old; female and male) of rhesus monkeys of Indian origin.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Animals to be used in these experiments, may have been used in other studies. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal frameworks described in art. 1<sup>o</sup> of the law on animal testing. In the case of an earlier use in malaria studies, a minimum of 6 months must have elapsed before a new malaria infection to avoid issues that may derive from the developing immunity towards the malaria parasites.

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

**Replacement.** Due to the limited host range of NHP malaria parasite species, only non-human primates can be used in this research. NHP malaria parasites are phylogenetically most closely related to human malaria parasites and thus the most relevant models for them. This relatedness is crucial when it comes to uncovering and validating relevant targets for the development of vaccines and new drugs that will be used as therapies to combat human malarias. Due to ethical restrictions, studies in human volunteers are not used to uncover or validate new drug targets and vaccine candidates. Human trials are only used for follow up purposes to determine whether candidate drugs and vaccines are safe and effective in humans after such candidate drugs and vaccines have been down-selected and validated through *in vitro* and animal experiments. The focus of our parasite studies will be on *P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. coatneyi*, *P. fragile*, *P. brasilianum*, *P. simiovale* and *P. fieldi* parasites. *P. knowlesi* is an important human parasite (zoonosis) in

South East Asia, while the other NHP parasites are good models for the human malarial *P. falciparum* (*P. coatneyi*, *P. fragile*), *P. vivax* (*P. cynomolgi*), *P. malariae* (*P. brasilianum*) and *P. ovale* (*P. simiovale*; *P. fieldi*), respectively. Currently, there are no blood stage culture systems available for NHP malaria parasites, except for *P. knowlesi*. Human malaria parasites except for *P. knowlesi* and *P. falciparum* can also not be cultured *in vitro*. Thus, to obtain parasite material for studies on any of the NHP parasites other than *P. knowlesi*, NHPs need to be used. One aim of this application is to attempt to set up blood stage cultures for the NHP parasites mentioned above, thus reducing the need to use animals to study parasite vulnerabilities and validate drug targets in the future. For *P. knowlesi* we still need limited monkey infections, to re-adapt the parasite to the *in vivo* situation in order to measure parasite growth kinetics *in vivo*, to adapt and study the characteristics of human and animal-derived field strains, to study (*in vitro* manipulated) parasites *in vivo* and to provide parasite stages that can be transmitted to mosquitoes. Previous attempts to transmit our *in vitro* adapted parasites without first passaging them through a NHP failed. At the moment, NHP cannot be replaced as these NHP parasites cannot be cultured *in vitro* yet. The transmission of *in vitro* adapted parasites without first passaging them through NHP remains an aim of this application, as the project as a whole is aimed at replacing NHPs by adapting NHP parasites to *in vitro* cultures. In this context, particular efforts will be made to culture-adapt strains while retaining their ability to be transmitted to mosquitoes. This has historically been a challenge as most Plasmodium strains lose their ability to be transmitted after being adapted to long-term *in vitro* culturing.

**Reduction.** The donor monkeys are used efficiently in that in transmission experiments, we are feeding the maximum number of mosquitoes, which we can handle in each experiment (1000-1500), to yield large numbers of sporozoites for further studies. Efficient use will be made of infected blood harvested from donor monkeys (e.g. making parasite stocks, studying blood stage growth characteristics and feeding mosquitoes), thus reducing the number of monkeys needed for infection of a specific NHP parasite strain.

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

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

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

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

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

Not applicable. This is not legally required research.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

### G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Discomfort by recovery from the sedation.

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

Explain why these effects may emerge.

Awakening from sedation can cause disorientation and nausea

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

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

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

In general, the symptoms of malaria in most NHP species are very mild at low parasitemia and are therefore hardly observed. If animals develop more severe symptoms, the parasitemia is immediately determined and if the parasitemia appears to be exceptionally high (>7%), the animals are immediately cured with chloroquine injections. Very mild malaria symptoms disappear spontaneously after a few hours, when the red blood cell rupture is over.

#### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

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

Indicate the likely incidence.

<1%

#### K. Classification of severity of procedures

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

Mild discomfort for most parasite donors (ca. 80% of the animals); moderate discomfort, if many pricks in the upper leg are required to study *in vivo* growth, or the malaria symptoms are more serious than expected (ca. 20% of the animals).

### End of experiment

#### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

In 20% of cases it will be necessary to obtain parasites directly from the liver (e.g. for 'omics comparison with *in vitro* grown parasite liver stages). The vast majority of animals will be cured and return to the experimental stock.

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

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

Yes



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project Malaria infectie van apen om parasieten te verkrijgen voor studies die geneesmiddelen- en vaccin ontwikkeling ondersteunen
- 1.2 Looptijd van het project 1 augustus 2018- 30 juli 2023
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) malaria, parasiet stadia, resusaap

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Malaria is één van de belangrijkste infectieziekten ter wereld, met desastreuze invloed op de sociaal-economische ontwikkeling van de getroffen landen. De ziekte veroorzaakt wereldwijd tot 500.000 doden per jaar en vele miljoenen worden ziek. Er bestaan geen effectieve vaccins en malariaparasieten worden in hoog tempo resistent tegen geneesmiddelen; onderzoek naar vaccins en nieuwe geneesmiddelen is dan ook noodzakelijk. Het doel van dit onderzoek is het verkrijgen van parasieten voor parasitologische, biochemische en moleculaire studies waarmee uiteindelijk nieuwe aangrijpingspunten voor

medicijnen en vaccinkandidaten kunnen worden geïdentificeerd en gevalideerd.

Er zijn 5 malariaparasietsoorten die de mens besmetten, maar de meeste daarvan kunnen alleen heel beperkt in de mens bestudeerd worden, omdat ze niet buiten de mens gekweekt kunnen worden. Een aantal malariaparasieten van apen zijn uitstekende modellen voor de menselijke parasieten. Na infectie kunnen de parasieten uit de besmette aap worden gehaald, ten behoeve van het onderzoek naar nieuwe medicijnen en vaccins. Ook deze parasieten kunnen niet buiten de aap gekweekt worden. Om parasietmateriaal te verkrijgen voor vervolgstudies worden daarom apen besmet met de parasiet.

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? De opbrengsten zijn vooral gericht op het vergroten van de kennis van de biologie van de humane parasieten, waar de apen malariavarianten model voor staan. Met deze kennis kunnen we gericht medicijnen en vaccins tegen de menselijke malariavarianten ontwikkelen.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? In 5 jaar tijd zullen maximaal 25 resusapen nodig zijn.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? Handelingen veroorzaken stress. Dit wordt zoveel mogelijk beperkt door dieren te trainen voor eenvoudige handelingen. Voor complexere handelingen worden dieren verdoofd. Dieren worden mogelijk ziek door malaria besmetting.
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? Het ongerief is maximaal matig, in de meeste gevallen (80%) licht.
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? De dieren worden genezen van malaria en blijven deel uitmaken van het dierbestand op het instituut. In enkele gevallen (~20%) zullen de dieren geëuthanaseerd worden om weefsel met parasieten te isoleren.

#### 4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**  
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. De parasiet ontwikkelingsstadia die nodig zijn voor verder onderzoek kunnen niet *in vitro* gekweekt worden en kunnen alleen verkregen worden uit besmette apen. Een onderdeel van het onderzoek is te proberen de parasieten aan te passen aan *in vitro* groei, waardoor apen niet meer nodig zullen zijn om parasietmateriaal te produceren.
- 4.2 **Vermindering**  
Leg uit hoe kan worden Verschillende onderzoeken aan de parasiet zullen worden gecombineerd met

verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

de parasieten uit 1 besmette aap, waardoor niet meer apen met dezelfde parasietstam besmet hoeven te worden. Zo zullen waar nodig tegelijkertijd parasietstocks gemaakt worden, muggen gevoed worden met besmet bloed en DNA/RNA/eiwit gezuiverd worden uit bloedstadiumparasieten voor moleculair/biochemisch onderzoek met de parasieten verkregen uit 1 apeninfectie.

#### 4.3 **Verfijning**

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

Het onderzoek gebeurt in apen, omdat de apen malariaparasieten uitstekende modellen vormen voor de menselijke malaria varianten, en alleen apen (en mensen) kunnen besmetten. Door langdurige ervaring met het diermodel zijn de protocollen verfijnd om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden. Het ongerief wordt beperkt door dieren te trainen voor eenvoudige handelingen. 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 malariaverschijnselen in apen zijn gering; de dieren worden vroegtijdig genezen en de gezondheidstoestand van de dieren wordt nauwkeurig geobserveerd.

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

Complexere handelingen worden uitgevoerd onder verdoving. Het gebruik van getrainde dieren voor eenvoudige handelingen vermindert de stress. Tijdens de infectie worden de dieren geobserveerd. Als ziekteverschijnselen optreden worden de dieren genezen.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen







# Advies aan CCD

Datum 06 juli 2018  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20185886

Instelling: Biomedical Primate Research Centre  
Onderzoeker: 10.2.e  
Project: Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development  
Aanvraagnummer: AVD20185886  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
Translationeel of toegepast onderzoek

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

<b>Proces</b>	Er zijn geen nadere vragen gesteld aan de DEC danwel aanvrager.			
<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort</b>	<b>Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Herkomst</b>
<b>3.4.4.1 Malaria infection of Rhesus monkeys</b>				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		25	<b>Niet menselijke primaten</b>

Er wordt gebruik gemaakt van NHP omdat de host range van de te gebruiken Plasmodium parasites erg beperkt is.

Een van de doelstellingen van deze aanvraag is mogelijk maken van in vitro kweek van de parasieten. Dit is nog niet mogelijk.

De dieren worden hergebruikt, volgens de wettelijke normen.

### Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Malaria infection of Rhesus monkeys / Rhesusapen (Macaca mulatta):  
Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

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

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	Citaten:
-------------------	----------

Citaten:

C9: De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met plasmodium soorten die ofwel identiek zijn aan of die een grote gelijkheid vertonen met plasmodium soorten bij de mens. Plasmodium soorten hebben een beperkte host range en de in de aanvraag beschreven soorten kunnen naast de mens alleen niet humane primaten infecteren.

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.

C14: In dit project worden malaria parasieten onderzocht die niet volledig in vitro zijn te kweken. Daarom blijven geïnfecteerde dieren nodig. Er wordt gedurende het project echter wel gewerkt aan het opzetten van in vitro kweeksystemen. Voor het verkrijgen van sporozoieten wordt een ex vivo techniek gebruikt waardoor voorkomen wordt dat de apen door de muggen gestoken moeten worden.

C15: Op basis van het aantal experimenten dat in de afgelopen jaren kan worden afgeleid dat een aantal van 25 dieren over een periode van vijf jaar een realistische inschatting is. Er wordt opgemerkt dat het aantal gebruikte dieren geringer is dan het aantal dierproeven door het toepassen van hergebruik.

C20: 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.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat:

1. Rechtvaardigt het verkrijgen van nieuwe kennis omtrent de fysiologie en groei-eigenschappen en het verkrijgen van parasietmateriaal van bij de mens voorkomende of sterk verwante malaria parasieten het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen.

2. De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de fysiologie en groei karakteristieken van de parasiet, hetgeen mogelijke aangrijpingspunten kan opleveren voor het ontwikkelen van nieuwe medicijnen en vaccins tegen malaria. Aangezien er momenteel nog geen afdoend malaria vaccin beschikbaar is en er resistentie optreedt tegen de huidige beschikbare medicijnen is deze kennis van groot belang.

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

De waarden voor de samenleving zijn deels gelegen in het in vitro testen van kandidaat medicijnen tegen malaria en deels in het verkrijgen van kennis, hetgeen kan leiden tot ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins in de toekomst. Daarmee is dit onderzoek van aanmerkelijk belang.

Vele miljoenen mensen lijden aan malaria en dit heeft een grote impact op welzijn en op economische productiviteit. Dit onderzoek kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

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

Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat de kennis omtrent de fysiologie van de malaria parasiet die in dit project wordt verkregen uiteindelijk kan bijdragen aan het ontwikkelen van effectieve medicijnen en vaccins tegen malaria

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 reeds zijn toegepast. De onderzoeker en het instituut bezitten de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor het verkrijgen van de benodigde malaria parasieten, 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. 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 analyses zijn deels binnen dit instituut opgezet en reeds eerder toegepast. Dit onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in de resusaap, aangezien alleen deze diersoort gevoelig is voor deze voor de mens relevante vormen van malaria. 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 (met behulp van positieve reinforcement training). 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 enkele tekstuele aanpassingen voorgesteld aan de aanvrager.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### 3 Kwaliteit DEC advies

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

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>-Het DEC advies is helder en navolgbaar.</li><li>-Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing.</li><li>- U geeft in het advies op heldere wijze aandacht aan punten die volgens u aandacht behoeven.</li><li>- De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</li><li>- U heeft in uw advies een voorwaarde voorgesteld betreffende beoordeling achteraf. Deze voorwaarde hebben wij overgenomen.</li></ul> |
|--|

#### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat: The overall objective of this project is the study of NHP parasites as models for human malarias in the context of drug and vaccine development. As parasite drug resistance against the most commonly used antimalarial drugs is continuously increasing and we do not have an effective malaria vaccine yet, we urgently need to identify and validate new drug targets and vaccine candidates. This requires a better understanding of the biology of the malaria parasites. In this context, it is important to note that about 70% of the parasite genome features conserved hypothetical proteins that have not yet been attributed a function to and which are unique to malaria parasites. State of the art biochemical, molecular and 'omics technologies will be used to dissect parasite vulnerabilities with the aim to target these vulnerabilities with new therapeutic approaches e.g. genes involved in parasite specific pathways that can be targeted without negative effects for the host; essential non-housekeeping, parasite specific genes active in all parasite stages, which could be targeted by one single drug; hypnozoite metabolic markers which will allow us to detect and selectively treat individuals who have developed hypnozoites thus optimizing the use of drugs with potentially severe adverse effects; genome sequencing of human P. knowlesi parasites showing differential blood stage growth characteristics in non-human primates to identify the genes involved, which may be good vaccine candidates; genes involved in the ability of the parasites to give rise to more/less hypnozoites that may be key to the hypnozoites development process thus being good drug targets. In this context, different aspects of NHP parasites will be investigated: Studies of blood- and liver stages of NHP parasites aimed at the identification of genes, proteins, metabolic pathways and the regulation thereof will be carried out in order to identify and validate new drug targets and vaccine candidates. For these studies we need parasite material from the different life-cycle stages, which cannot be obtained through in vitro culture and are thus derived from monkey infections.</p>
-------------------------------------	---

<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat: Malaria is one of the most important human infectious diseases. Yearly around 500,000 people die of malaria and overall 3,2 billion people in 95 countries are at risk of malaria infection. There are five Plasmodium species that infect humans: <i>P. falciparum</i>, <i>P. vivax</i>, <i>P. malariae</i>, <i>P. ovale</i> and <i>P. knowlesi</i> (a zoonosis). In the absence of working vaccines for any of these species and knowing that drug resistance develops very fast, there is an urgent need to identify new drug and vaccine targets for novel treatment development, to ultimately eliminate malaria. As described under 3.1, we use excellent NHP malaria models for the human malarias to assist in this urgent need.</p> <p>Malaria eradication is still a primary goal of the international community as it would have a tremendous positive socio-economic impact on the populations living in malaria endemic areas. The study of the biology of NHP parasites, which are considered good models for the neglected human malaria parasites, <i>P. vivax</i>, <i>P. malariae</i> and <i>P. ovale</i>, will further this goal as it will provide therapeutic avenues for the treatment of these parasites, which have unique characteristics as described in 3.1. In this context, it is important to note that while the sustained efforts in the fight against <i>P. falciparum</i> resulted in a decline in the incidence of <i>P. falciparum</i> malaria, this positive development went hand in hand with an increase in the incidence of the neglected human malarias (<i>P. vivax</i>, <i>P. malariae</i>, <i>P. ovale</i>) and the zoonosis <i>P. knowlesi</i>, thus threatening the prospects of malaria eradication.</p> <p>One of the reasons that has led the scientific community to neglect <i>P. vivax</i>, <i>P. malariae</i> and <i>P. ovale</i> malaria parasites, is the inability to adapt these parasites species to long-term in vitro growth despite attempts being made for over 50 years. One aim of this application is to attempt to adapt the above-mentioned NHP parasites, which are considered good models for <i>P. vivax</i>, <i>P. malariae</i> and <i>P. ovale</i>, to long-term in vitro blood stage cultures, thus reducing the need to use animals to study parasite vulnerabilities and validate drug targets in the future, while making it possible to increase our study capabilities vis-à-vis of the neglected human malaria parasites. In this context, particular efforts will be made to culture-adapt strains while retaining their ability to be transmitted to mosquitoes. This has historically been a scientific challenge as most Plasmodium strains lose their ability to be transmitted after being adapted to long-term in vitro culturing.</p>
<p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>11.1</p>

<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	De DEC zegt hierover: "De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn boven iedere twijfel verheven gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's. De onderzoeksgroep heeft vele jaren ervaring met experimentele infectie van diverse apen soorten met diverse vormen van malaria. Tevens heeft de onderzoeker veel ervaring met bestuderen van de biologie van de malaria parasiet, door middel van diverse 'omics' technieken."  11.1
---	--

3V's

Vervanging

**3.4.4.1 Malaria infection of Rhesus monkeys:** Citaat: Due to the limited host range of NHP malaria parasite species, only non-human primates can be used in this research. NHP malaria parasites are phylogenetically most closely related to human malaria parasites and thus the most relevant models for them. This relatedness is crucial when it comes to uncovering and validating relevant targets for the development of vaccines and new drugs that will be used as therapies to combat human malarias. Due to ethical restrictions, studies in human volunteers are not used to uncover or validate new drug targets and vaccine candidates. Human trials are only used for follow up purposes to determine whether candidate drugs and vaccines are safe and effective in humans after such candidate drugs and vaccines have been down-selected and validated through in vitro and animal experiments. The focus of our parasite studies will be on *P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. coatneyi*, *P. fragile*, *P. brasilianum*, *P. simiovale* and *P. fieldi* parasites. *P. knowlesi* is an important human parasite (zoonosis) in South East Asia, while the other NHP parasites are good models for the human malarias *P. falciparum* (*P. coatneyi*, *P. fragile*), *P. vivax* (*P. cynomolgi*), *P. malariae* (*P. brasilianum*) and *P. ovale* (*P. simiovale*; *P. fieldi*), respectively. Currently, there are no blood stage culture systems available for NHP malaria parasites, except for *P. knowlesi*. Human malaria parasites except for *P. knowlesi* and *P. falciparum* can also not be cultured in vitro. Thus, to obtain parasite material for studies on any of the NHP parasites other than *P. knowlesi*, NHPs need to be used. One aim of this application is to attempt to set up blood stage cultures for the NHP parasites mentioned above, thus reducing the need to use animals to study parasite vulnerabilities and validate drug targets in the future. For *P. knowlesi* we still need limited monkey infections, to re-adapt the parasite to the in vivo situation in order to measure parasite growth kinetics in vivo, to adapt and study the characteristics of human and animal-derived field strains, to study (in vitro manipulated) parasites in vivo and to provide parasite stages that can be transmitted to mosquitoes. Previous attempts to transmit our in vitro adapted parasites without first passaging them through a NHP failed. At the moment, NHP cannot be replaced as these NHP parasites cannot be cultured in vitro yet. The transmission of in vitro adapted parasites without first passaging them through NHP remains an aim of this application, as the project as a whole is aimed at replacing NHPs by adapting NHP parasites to in vitro cultures. In this context, particular efforts will be made to culture-adapt strains while retaining their ability to be transmitted to mosquitoes. This has historically been a challenge as most Plasmodium strains lose their ability to be transmitted after being adapted to long-term in vitro culturing.



Verminderen	
	<p><b>3.4.4.1 Malaria infection of Rhesus monkeys:</b> Citaat: The donor monkeys are used efficiently in that in transmission experiments, we are feeding the maximum number of mosquitoes, which we can handle in each experiment (1000-1500), to yield large numbers of sporozoites for further studies. Efficient use will be made of infected blood harvested from donor monkeys (e.g. making parasite stocks, studying blood stage growth characteristics and feeding mosquitoes), thus reducing the number of monkeys needed for infection of a specific NHP parasite strain.</p>
Verfijnen	
	<p><b>3.4.4.1 Malaria infection of Rhesus monkeys:</b> Citaat: The blood-stage parasitemia of NHP-parasites in rhesus monkeys is reasonably predictable, both in the case of blood stage and sporozoite infections. Through this knowledge we can restrict the needed thigh pricks to a minimum (in any case in parasite infections that have been used in rhesus monkeys before). For "uncharacterized" parasites the parasitemia development may be less predictable, but in such cases, we plan thigh pricks strategically around periods in which parasites are being expected to reduce the discomfort for the animals while being able to follow the parasitemia development accurately nonetheless. Moreover, we are using trained animals (positive reinforcement training), which voluntarily offer their thigh for a prick, after which they receive a reward. This reduces the stress for the animals. The mosquito feedings are performed ex vivo, so that the animals do not suffer from the mosquito bites. After infection, the animals are scored daily to assess clinical symptoms by using a clinical scoring list (such as for example (appetite, normal activity pattern, normal defecation and urination patterns etc.).</p> <p>The malaria infection itself gives mild malaria symptoms (at higher parasitemia), as for example fever, decreased appetite and reduced activity when the parasite ruptures from the infected red blood cell. Animal caretakers check the animals on a daily basis and warn the researcher when needed. The development of the infection is closely watched and the infection is immediately cured if the above-described symptoms of infection worsen or continue for more than half a day. The use of trained animals, as described above, reduces the stress the animals experience during handling.</p>
<b>3.4.4.1 Malaria infection of Rhesus monkeys:</b> ██████████ .	
<b>Hergebruik</b>	Er is sprake van hergebruik van dieren.

3.4.4.1 Malaria infection of Rhesus monkeys: Citaat: Animals to be used in these experiments, may have been used in other studies. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal frameworks described in art. 1e of the law on animal testing. In the case of an earlier use in malaria studies, a minimum of 6 months must have elapsed before a new malaria infection to avoid issues that may derive from the developing immunity towards the malaria parasites.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Malaria infection of Rhesus monkeys	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
<b>3.4.4.1 Malaria infection of Rhesus monkeys</b>	HEP: <1%	Citaat: If an animal unexpectedly becomes severely sick with an extremely high parasitemia that cannot be treated on time, this will be considered a humane endpoint.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 20,0% Matig 80,0% Licht	Ongeveer 20% van de dieren zullen worden gedood voor verkrijgen van parasieten uit de lever. De overige dieren worden genezen en gaan terug naar de experimentele voorraad.

## 5 Samenvatting

De aanvraag bevat voldoende informatie over de doelstelling, het belang, de 3V's en de Humane eindpunten om tot een afweging te komen.

Vanwege gebruik van NHP moet een beoordeling achteraf plaatsvinden.

Het betreft onderzoek met NHP. het gebruik van NHP is nodig omdat de te groeien parasieten alleen NHP (en de mens) infecteren.

De dieren worden genezen en kunnen worden hergebruikt, waarbij aan de wettelijke eisen voor hergebruik wordt voldaan. Een deel van de dieren (ongeveer 20%) zal worden gedood aan het einde van de proef, wanneer parasieten uit de lever moeten worden geïsoleerd.

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

11.1



## **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 juli 2024 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

### *Ter informatie*

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

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

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.

## **8 Concept beschikking voor akkoord CCD**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD5020020185886  
**Bijlagen**  
1

Datum 24 juli 2018  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.g

Op 8 juni 2018 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development " met aanvraagnummer AVD5020020185886. 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 augustus 2018 tot en met 31 juli 2023.

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

#### **Procedure**

##### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie (DEC) 10.2.g. Dit advies is ontvangen op 26 juni 2018. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Datum:**  
24 juli 2018  
**Aanvraagnummer:**  
AVD5020020185886

*Nadere vragen aanvrager*

Op 16 juli 2018 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op een kleine inconsistentie in de NTS. 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 juli 2024 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

**Bezwaar**

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 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.

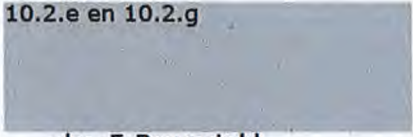
**Meer informatie**

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

**Datum:**  
24 juli 2018  
**Aanvraagnummer:**  
AVD5020020185886

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

i.o.  
10.2.e en 10.2.g



drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2018 tot en met 31 juli 2023, voor het project "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development " met aanvraagnummer AVD5020020185886, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g .

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.g

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 8 juni 2018
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 26 juni 2018;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.4.1 Malaria infection of Rhesus monkeys, zoals ontvangen op 26 juni 2018;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 18 juli 2018;
  - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 26 juni 2018
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 18 juli 2018.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
<b>3.4.4.1 Malaria infection of Rhesus monkeys</b>			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	25	20,0% Matig 80,0% Licht

### Voorwaarden

#### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2024 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

**Aanvraagnummer:**  
AVD5020020185886

*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:**

AVD5020020185886

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**  
AVD5020020185886

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

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

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

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

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

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

#### **Levensloofdossier**

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

#### **Niet-menselijke primaten**

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

#### **Beoordeling achteraf**

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

**Aanvraagnummer:**  
AVD5020020185886

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