	Inventaris Wob-verzoek W21-04									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS20186346	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 origineel			x						
3	projectvoorstel				x				x	
4	Bijlage dierproeven 1			x						
5	Bijlage dierproeven 2			x						
6	Bijlage dierproeven 3			x						
7	aanhouden beoordelen brief				x		x			
8	aanvullende informatie				x		x		x	
9	Aanvraagformulier herzien				x		x		x	
10	Projectvoorstel herzien				x				x	
11	Bijlage dierproeven 1 herzien			x						
12	Bijlage dierproeven 2 herzien			x						
13	Bijlage dierproeven 3 herzien			x						
14	NTS definitief	x								
15	DEC advies				x				x	
16	Advies CCD				x		x			x
17	Beschikking en vergunning				x		x		x	

31 AUG 2018

Centrale Commissie Dierproeven

1

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

X Ja > *Vul uw deelnemernummer in*	50200
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Biomedical Primate Research Centre	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e	
KvK-nummer	41146967	
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	

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	X Dhr. ☐ Mw.
Functie	10.2.g	
Afdeling		
Telefoonnummer	10.2.g	
E-mailadres		

1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.
Functie		
Afdeling		
Telefoonnummer		
E-mailadres		

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01 - 11 - 2018
		Einddatum	31 - 10 - 2023
3.2	Wat is de titel van het project?	Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Malaria infectie van apen om parasieten te verkrijgen voor studies die geneesmiddelen- en vaccin ontwikkeling ondersteunen	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	10.2.g
		Postadres	10.2.g
		E-mailadres	10.2.g

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	☐ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1791 Lege ☐ Wijziging € Lege
4.2	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. *Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*	☐ Via een eenmalige incasso X Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

X Projectvoorstel

X Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	10.2.e
Functie	10.2.g
Plaats	Rijswijk
Datum	30 - 08 - 2018
Handtekening	10.2.g

[redacted]

2

Format
Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- ☒ Fundamenteel onderzoek
- ☒ Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of	Malaria is een van de belangrijkste infectieziekten ter wereld, met desastreuze invloed op de sociale en economische ontwikkeling van de betreffende gebieden. De ziekte veroorzaakt wereldwijd tot 660.000 doden per jaar en vele miljoenen worden ziek. Er bestaan geen effectieve vaccins en malariaparasieten worden in hoog tempo resistent tegen geneesmiddelen. Een vaccin zou de oplossing zijn, maar ondanks meer dan 75 jaar onderzoek is er nog geen goed vaccin beschikbaar. Het onderzoek naar malariavaccins wordt gehinderd door gebrek aan 1) begrip van de immuniteit tegen malaria, 2)

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

4 Drie V's

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

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

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	
Andere opmerkingen	

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	Provide the title of the project.	Study of parasite host-interactions and efficacy of new treatment methods in non-human primate malaria models relevant to human malaria infection.

2 Categories

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

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

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

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

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

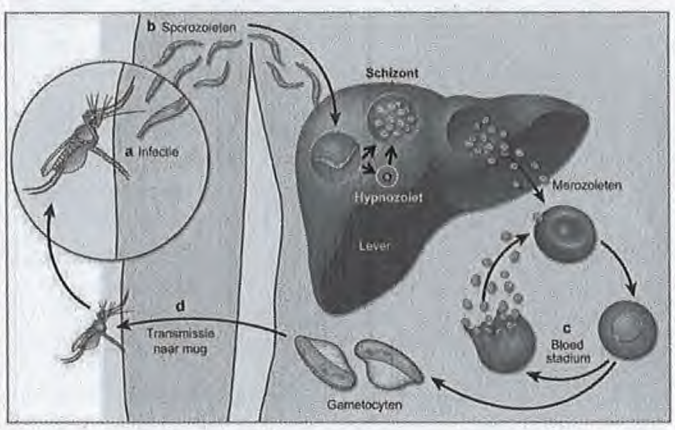

Figure 1. The life cycle of the malaria parasite. Sporozoites are transmitted from a mosquito to a vertebrate host and travel to the liver. Hypnozoites in the liver are only formed by *P. vivax*, *P. ovale* (human malarias), and a limited number of non-human primate malaria parasites. Merozoites leave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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2 Purpose

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

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

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

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

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

Referenties

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

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

3.3 Relevance

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

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

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

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

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

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

3.4 Research strategy

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 1 Type of animal procedure: Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in macaque models relevant to human malaria

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B. The animals

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

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

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

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

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

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

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

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

☒No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement.

No *in vitro* system exists to date that can reproduce the complexity of an organism's immune system. These experiments need to be performed in live animals, becausè we need to investigate the reaction to vaccination and challenge of the different soluble and tissue components of the immune system to determine the safety and efficacy of vaccines, vaccine strategies and adjunct therapies. In this context, we will test radical new thinking and immunological models with major application for vaccine efficacy/failure; and conduct parasite-host interaction research aimed at uncovering the immune responses conferring protective immunity to malaria; the mechanisms behind the variable susceptibility to malaria resulting in different disease presentations; biomarkers of protection, disease progression and complications and correlates of immunity for malaria vaccines. Ultimately, the combination of these insights will lead to the rational design of better therapies for malaria.

Whenever new vaccines are being tested in non-human primates, preliminary rodent experiments have usually been conducted to test safety, immunogenicity and efficacy. As a next step, we use the non-human primate malaria models, as the immune system of the non-human primate and of humans has great similarity in the response to malaria infection. To answer some of the questions underlying vaccine efficacy and vaccine failure, as well as to conduct research into correlates of protection, rodent models are inadequate, as we need a host that is as closely related to humans as possible. Adjunct therapies and vaccines strategies are also tested in mice or experimental models of human malaria (CHMI), but there are a number of significant limitations to the insights that can be obtained using these models.

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

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

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

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

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

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

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

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

Explain why these effects may emerge.

Awakening from sedation can cause disorientation and nausea

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

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

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

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

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

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

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

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

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

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

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

☒ Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 2 Type of animal procedure: Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in marmoset models relevant to human malaria

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B. The animals

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

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

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

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

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

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

☒No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

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

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

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

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

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

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

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

Explain why these effects may emerge.

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

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

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

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

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

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

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

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

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

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

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

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

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

☒ Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 3 Type of animal procedure: PK/PD studies in rhesus macaques

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B. The animals

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

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

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

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

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

☒No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

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

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

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

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

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

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☒ No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

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

Explain why these effects may emerge.

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

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

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

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

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

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

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

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

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

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

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

X Yes

Centrale Commissie Dierproeven

7

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020186346

Datum 26 oktober 2018
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e ,

Op 30 augustus 2018 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development" met aanvraagnummer AVD5020020186346. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

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

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

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

worden voordat de marmosets daadwerkelijk gebruikt worden. U wordt verzocht dit toe te lichten.
Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen
Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

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

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:
- Melding bijlagen

Centrale Commissie Dierproeven

Melding bijlagen

U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg altijd deze Melding Bijlagen toe.
Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Biomedical Primate Research Centre

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD5020020186346

2 Bijlagen
Welke bijlagen stuurt u mee?
Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

O Projectvoorstel

O Beschrijving Dierproeven

O Niet-technische samenvatting

O Melding Machtiging

O Aanvraagformulier

O .....

O .....

O .....

Datum:
26 oktober 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020186346

3 Ondertekening

Naam: .....

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

Handtekening: .....

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

8

BPRC

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

Lange Kleiweg 161
P.O. Box 3306
2280 GH Rijswijk
The Netherlands
1
www.bprc.nl

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

Subject projectvergunningaanvraag AVD5020020186346

Geachte 10.2.e

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

Hieronder vind u onze antwoorden op de twee gestelde vragen:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met vriendelijke groet 10.2.g

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven

9

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

X Ja > *Vul uw deelnemernummer in*	50200
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Biomedical Primate Research Centre	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e	
KvK-nummer	41146967	
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	

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	☐ Dhr. X Mw.
Functie	10.2.g	
Afdeling	10.2.g	
Telefoonnummer	10.2.e	
E-mailadres	10.2.e	

1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	X Dhr. ☐ Mw.
Functie	Afdelingshoofd	
Afdeling	10.2.g	
Telefoonnummer	10.2.e	
E-mailadres	10.2.g	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01 - 11 - 2018
		Einddatum	31 - 10 - 2023
3.2	Wat is de titel van het project?	Study of parasite host-interactions and efficacy of new treatment methods in non-human primate malaria models relevant to human malaria infection	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Bestudering van ziektemechanismen en de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes in niet-menselijke primaten modellen van humane malaria infecties	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	10.2.g
		Postadres	10.2.g
		E-mailadres	10.2.g

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht	
X	Projectvoorstel
X	Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing	
☐	Melding Machtiging
☐	

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	10.2.e
Functie	10.2.g
Plaats	Rijswijk
Datum	- - 2015
Handtekening	

Centrale Commissie Dierproeven

10

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	Provide the title of the project.	Study of parasite host-interactions and efficacy of new treatment methods in non-human primate malaria models relevant to human malaria infection.

2 Categories

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

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

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

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

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

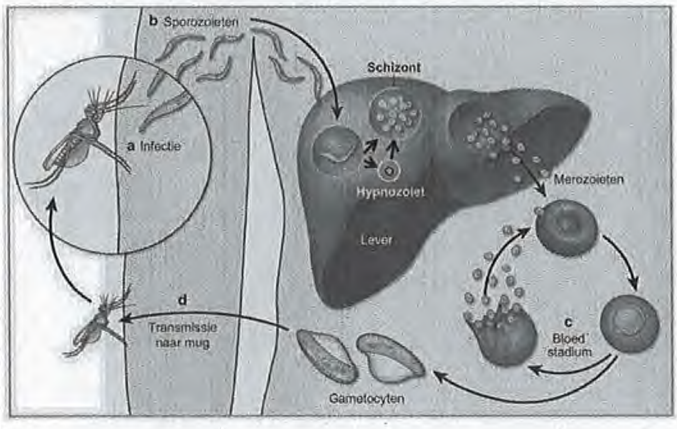

Figure 1. The life cycle of the malaria parasite. Sporozoites are transmitted from a mosquito to a vertebrate host and travel to the liver. Hypnozoites in the liver are only formed by *P. vivax*, *P. ovale* (human malarias), and a limited number of non-human primate malaria parasites. Merozoites leave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

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

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

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

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

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

very specific, most monkey malarias infect also humans and some are important zoonoses. Experimental models of the two most important human malarias (*P. falciparum* and *P. vivax*) are limited to chimpanzees, *Aotus* en *Saimiri* monkeys. The parasites must be adapted to these monkeys and most of the time it is necessary to splenectomize such animals to obtain blood stage infection with these parasites. Due to these restrictions and to the very limited availability of these monkey species for biomedical research, these models are rarely used, however valuable they may be (10). *P. ovale* and *P. malariae* suffer from the same limitations in terms of available models. *P. knowlesi* is a zoonosis that can be modeled in macaques or marmosets.

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2 Purpose

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

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

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

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

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

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

Referenties

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

[redacted] 10.2.g [redacted]

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

3.3 Relevance

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

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

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

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

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

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

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

3.4 Research strategy

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

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

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

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

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

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

Use of donors

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

Criteria for the selection of different NHP species and proposed studies

Testing of vaccine candidate, innovative vaccination strategy and adjunct therapies

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

Parasite-host interaction studies

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

11

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 1 Type of animal procedure: Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in macaque models relevant to human malaria

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B. The animals

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

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

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

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

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

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

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

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

☒No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement.

No *in vitro* system exists to date that can reproduce the complexity of an organism's immune system. These experiments need to be performed in live animals, because we need to investigate the reaction to vaccination and challenge of the different soluble and tissue components of the immune system to determine the safety and efficacy of vaccines, vaccine strategies and adjunct therapies. In this context, we will test radical new thinking and immunological models with major application for vaccine efficacy/failure; and conduct parasite-host interaction research aimed at uncovering the immune responses conferring protective immunity to malaria; the mechanisms behind the variable susceptibility to malaria resulting in different disease presentations; biomarkers of protection, disease progression and complications and correlates of immunity for malaria vaccines. Ultimately, the combination of these insights will lead to the rational design of better therapies for malaria.

Whenever new vaccines are being tested in non-human primates, preliminary rodent experiments have usually been conducted to test safety, immunogenicity and efficacy. As a next step, we use the non-human primate malaria models, as the immune system of the non-human primate and of humans has great similarity in the response to malaria infection. To answer some of the questions underlying vaccine efficacy and vaccine failure, as well as to conduct research into correlates of protection, rodent models are inadequate, as we need a host that is as closely related to humans as possible. Adjunct therapies and vaccines strategies are also tested in mice or experimental models of human malaria (CHMI), but there are a number of significant limitations to the insights that can be obtained using these models.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

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

Explain why these effects may emerge.

Awakening from sedation can cause disorientation and nausea

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

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

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

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

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

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

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

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

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

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

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

☒ Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 2 Type of animal procedure: Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in marmoset models relevant to human malaria

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B. The animals

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

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

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

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

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

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

☒No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

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

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

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

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

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

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

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

Explain why these effects may emerge.

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

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

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

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

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

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

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

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

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

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

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

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

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

☒ Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 3 Type of animal procedure: PK/PD studies in rhesus macaques

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B. The animals

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

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

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

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

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

☒No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

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

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

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

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

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable. This is not legally required research.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☒ No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

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

Explain why these effects may emerge.

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

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

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

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

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

Indicate the likely incidence.

<5%

K. Classification of severity of procedures

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

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

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

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

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

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

X Yes

15

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD5020020186346

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

3. Titel van de NTS: Bestudering van ziektemechanismen en de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes in niet-menselijke primaten modellen van humane malaria infecties

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

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

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☒ ontvangen door DEC: 31-08-2018
   - ☒ aanvraag compleet: 31-08-2018
   - ☒ in vergadering besproken: 07-09-2018
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☒ termijnonderbreking(en) van 13-09-2018 tot 26-09-2018
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☒ aanpassing aanvraag: 26-09-18-2018
   - ☒ advies aan CCD: 01-10-2018

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

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

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

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

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum: 13-09-2018
   - Gestelde vraag/vragen: Een paar tekstuele wijzingen, verduidelijking van de beschrijving van het directe en uiteindelijke doel, samenhang tussen beschreven subdoelen en bijlages, nadere onderbouwing van de te gebruiken diersoorten, het benodigde aantal dieren en de inschatting van het ongerief.
   - Datum antwoord: 26-09-2018
   - Verstrekt(e) antwoord(en): De tekst is op diverse plaatsen aangepast en de correcte titels van de NTS en het projectvoorstel zijn nu opgenomen in de aanvraag projectvergunning dierproeven. Het doel is nader omschreven in zowel NTS als projectvoorstel. In het projectvoorstel is de samenhang tussen subdoelen en bijlages nader uitgewerkt en worden de redenen voor het gebruik van de verschillende apen soorten nader omschreven. De bijlages zijn aangepast wat betreft onderbouwing van het aantal dieren en ongerief.
   - De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen onderzoek naar parasitaire pathogenen, vaccin onderzoek, de immunologie, statistische analyse, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming.

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Er waren geen conflicterende belangen bij de beoordeling van dit voorstel.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het voorgestelde onderzoek bestaat uit drie subdoelen, te weten 1) het bestuderen van parasiet-gastheer interacties in diverse malaria infectie modellen in niet-humane primaten (NHP) die relevant zijn voor de mens, 2) evaluatie van de immunogeniciteit en effectiviteit van kandidaat vaccins tegen malaria in NHP en 3) evaluatie van de effectiviteit van nieuw ontwikkelde immuuntherapieën of immuun-modulatoire middelen tegen malaria in NHP. Deze studies worden uitgevoerd in resus apen, Java apen (beide beschreven in bijlage 1) of penseel aapjes (beschreven in bijlage 2). Voorafgaand aan de evaluatie van sommige kandidaat therapieën moet eerst de juiste dosering worden vastgesteld middels een PK/PD studie (beschreven in bijlage 3). De keuze voor de diersoort wordt bepaald door de te moduleren humane malaria infectie en het subdoel van het experiment. Testen van kandidaat vaccins (subdoel 2) of immuuntherapieën en immuun-modulatoire middelen tegen malaria (subdoel 3) zal overwegend plaats vinden in resus apen, aangezien dit model daarvoor het best gekarakteriseerd is. Alleen indien de effectiviteit tegen bepaalde malariaparasieten (*P. brasilianum/malariae)* bestudeerd moet worden waarvoor de resus aap geen goed model vormt, zal het experiment in common penseel aapjes worden gedaan. Hiervoor dient eerst het infectie model nader gekarakteriseerd te worden in de penseel aap voor de te testen malariaparasiet. Het bestuderen van parasiet-gastheer interacties zal deels plaats vinden in resus apen (als model voor ziektebeelden met een meer acuut verloop), Java apen (meer chronische beloop) of penseel aapjes. Penseel aapjes zijn nodig als makaken geen goed model vormen voor de te testen malariaparasiet, als intra-vital imaging nodig is of bij bestuderen van bepaalde immuun aspecten waarvoor beenmerg chimeren nodig zijn (alleen bij penseel aapjes worden meestal tweelingen geboren die beenmerg chimeer zijn). De vaccin en therapie evaluatie studies dragen tevens bij aan het identificeren en valideren van biomerkers voor de diverse stadia van de ziekte en het vinden van biomerkers voor protectie. De experimenten beschreven in bijlage 3, namelijk PK/PD studies, zijn nodig voor het testen van kandidaat therapieën in bijlage 1 en 2. De subdoelen sluiten logisch bij het hoofddoel, namelijk het bevorderen van de ontwikkeling van vaccins, vaccinatie strategieën en immuuntherapieën tegen malaria bij de mens. Het verwachte ongerief voor de dieren is duidelijk omschreven en de uitkomsten van de voorgestelde experimenten zijn helder en meetbaar. Het aantal dierproeven is realistisch ingeschat op basis van ervaring van de afgelopen jaren. De klinische eindpunten zijn duidelijk gedefinieerd.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorieën, te weten 'fundamenteel onderzoek' en 'translationeel of toegepast onderzoek', sluiten aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag wordt enerzijds onderzoek gedaan naar malaria pathogenese en de invloed van het immuunsysteem en genetische factoren van de gastheer daarop. Daarnaast wordt de effectiviteit van nieuwe vaccin kandidaten, immuuntherapieën en/of immuun-modulatoire middelen tegen malaria onderzocht, hetgeen een grote toegepaste waarde heeft. De kennis verkregen met het onderzoek naar de pathogenese van malaria en de invloed van gastheer factoren hierop kan leiden tot identificatie en validatie van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte. Tevens worden nieuwe wetenschappelijke inzichten verkregen over welke factoren een belangrijke rol spelen bij de malariaparasiet-gastheer interactie, hetgeen mogelijk kan worden toegepast bij de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins tegen malaria.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Het directe doel van het project is het verkrijgen van meer inzicht in de pathogenese van malaria, het verkrijgen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte, het testen van kandidaat vaccins en immuuntherapieën en immuunmodulatoire middelen op effectiviteit tegen malaria. Het uiteindelijke doel is deels om een beter begrip te krijgen van de pathogenese van malaria, het verkrijgen van biomerkers voor ziekteprogressie en bescherming tegen ziekte en het ontwikkelen van een vaccin en nieuwe therapieën tegen malaria. Onderzoek naar pathogenese van malaria en de invloed van genetische factoren bij de mens wordt beperkt door grote verschillen in infectie historie, invloed van omgevingsfactoren en immuun status en is daardoor beter te besturen in de NHP infectie modellen met malaria parasieten die sterk overeenkomen of identiek zijn aan malaria parasieten die de mens infecteren. Kandidaat vaccins en therapieën dienen eerst op effectiviteit en veiligheid getest te worden in dieren alvorens klinische evaluatie kan plaats vinden. De NHP malaria infectie modellen zijn daarvoor essentieel vanwege de grote overeenkomst met de mens wat betreft fysiologie en immuunsysteem en gevoeligheid voor malaria parasieten die identiek zijn of sterk gelijken op de parasieten die de mens infecteren. Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld).* De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op inzicht verkrijgen in de pathogenese van malaria, het verkrijgen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte en het testen van kandidaat vaccins en kandidaat therapieën op effectiviteit tegen malaria en veiligheid zijn: de maatschappij, de te genezen personen, het onderzoeksveld en de proefdieren.

   Het belang voor de samenleving is dat met het beschikbaar komen van een vaccin of nieuwe therapieën en biomerkers malaria infectie voorkomen of beter genezen kan worden. Hierdoor wordt ook de verdere verspreiding, door muggen, onder de menselijke populatie voorkomen. Dit resulteert in; een sterke verbetering van de gezondheid van grote groepen mensen, een sterke beperking van de uitgaven voor verpleging en medicatie en minder verlies in economische productiviteit.

   Voor mensen die besmet raken met malaria is het beschikbaar komen van nieuwe vaccins en effectieve middelen tegen malaria van groot belang. Voor sommige vormen van malaria is er momenteel maar 1 medicijn beschikbaar. Bovendien is resistentie waargenomen tegen veel van de huidig gebruikte medicijnen. Daarnaast is het beschikbaar komen van een vaccin tegen malaria essentieel voor het beschermen van grote groepen mensen tegen deze parasiet. Het beschikbaar komen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte kan bijdragen aan een betere behandeling van de patiënten.

   Voor het onderzoeksveld is het verkrijgen van nieuwe kennis over de pathogenese van malariaparasiet van groot belang. Deze kennis kan bijdragen aan het ontwikkelen van vaccins en nieuwe therapieën tegen malaria. Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s).

   Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen stress ondervinden, in lichte mate ziek worden en soms enige mate van pijn ondervinden. Naar schatting 70 tot 80% van de dieren zal gedood worden aan het eind van de studie teneinde onderzoek aan de weefsels te kunnen doen.

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

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn boven iedere twijfel verheven gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's. De onderzoeksgroep heeft vele jaren ervaring met experimentele infectie van diverse apen soorten met diverse vormen van malaria, vaccin onderzoek en evaluatie van kandidaat geneesmiddelen. Tevens heeft de onderzoeker veel ervaring met bestuderen van de biologie van de malariaparasiet, door middel van diverse 'omics' technieken.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. Het in bijlage 1 beschreven infectie model is reeds vele malen toegepast en zal leiden tot het verkrijgen van de voor verder onderzoek benodigde resultaten. Het in bijlage 2 beschreven malaria infectie model in penseel aapjes is minder ver ontwikkeld. In de eerste fase van het onderzoek zal dit model nader gekarakteriseerd worden. Binnen het instituut wordt deze diersoort echter wel vaak gebruikt in biomedisch onderzoek en er is veel ervaring met evaluatie van vaccins en kandidaat geneesmiddelen in deze diersoort. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstellingen in het kader van het project.

Welzijn dieren

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

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

De keuze voor deze diersoorten is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met plasmodium soorten die ofwel identiek zijn aan of die een grote gelijkenis vertonen met plasmodium soorten bij de mens. Plasmodium soorten hebben een beperkte host range en de in

de aanvraag beschreven soorten kunnen naast de mens alleen niet humane primaten infecteren. Bovendien vertonen deze diersoorten zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens.
Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Ook gebruik in een eerdere malaria studie vormt, na een rustperiode van 6 maanden, geen belemmering voor hergebruik. Het werkelijke aantal dieren die binnen dit project gebruikt gaan worden zal daardoor lager uitvallen. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.
De huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief is op basis van ervaring met malaria infectie studies in niet-humane primaten correct als licht ingeschat voor de parasiet donors. Bij de overige dieren die in vaccin of therapie evaluatiestudies gebruikt worden zal naar schatting bij 50% van de makaken en 80% van de penseel aapjes waarbij in verhouding vaak bloed moet worden afgenomen het ongerief matig zijn. Bij de overige dieren zal het ongerief licht zijn. Het ongerief zal matig zijn voor de PK/PD studies. Het ongerief wordt veroorzaakt door de experimentele technieken, de toegediende vaccins of therapieën en de klinische symptomen ten gevolge van de infectie. Monitoren van klinische symptomen en veelvuldig meten van de parasitemie wordt gebruikt om tijdig in te grijpen en de dieren te genezen voordat ernstige ziekteverschijnselen en daarmee ernstig ongerief optreden. De dieren zijn speciaal voor dit doel gefokt, en zullen als sociaal compatibel duo worden gehuisvest.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de dieren te infecteren met malaria en door de toediening van vaccins of therapieën tegen malaria. Deze aantasting is van voorbijgaande aard voor ~20-30% van de dieren, deze dieren worden behandeld tegen de infectie. Ongeveer 70-80% van de dieren zal worden ge-euthanaseerd tijdens het experiment om de weefsels te kunnen onderzoeken. De integriteit van de dieren die voor PK/PD studies worden gebruikt wordt aangetast door de toediening van kandidaat therapieën en frequente bloedafnames en in een aantal gevallen door infectie met malaria. Alleen in enkele gevallen zullen de dieren tijdens het experiment worden gedood om de biologische respons op de test substantie in de weefsels te bestuderen. Voor het merendeel van de dieren is de aantasting van de integriteit van voorbijgaande aard.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe. Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de kans dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken terecht als laag ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De malariaparasiet heeft een complexe levenscyclus waarbij diverse weefsels uit de gastheer betrokken zijn. Daarnaast is de interactie met het immuunsysteem van groot belang voor het beloop van de ziekte. Dit complexe systeem is momenteel nog niet goed *in vitro* te modelleren. Er is geen *in vitro* model beschikbaar waarin een immuunrespons kan worden opgewekt, of dat de beschermende werking van vaccins kan meten.

Er kan veel informatie betreffende specificiteit en hoogte van de immuunrespons worden verkregen uit *in vitro* assays die zullen worden uitgevoerd met het materiaal afkomstig van de dieren, maar het gebruik van proefdieren kan nog niet worden overgeslagen. Of een vaccin of een immuuntherapie of immuunmodulatoir middel bescherming kan bieden tegen malaria infectie kan alleen zinvol getest worden in niet humane primaten. Plasmodium soorten hebben een beperkte host range en de in de aanvraag beschreven soorten kunnen naast de mens alleen niet humane primaten infecteren. Bovendien vertonen deze diersoorten zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens. De kennis verkregen uit deze studies kan gebruikt worden als input voor *in silico* modellen, waardoor in toekomstige experimenten minder dieren nodig zullen zijn.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe. Het aantal benodigde dieren voor de *in vivo* evaluatie van de effectiviteit van kandidaat vaccins en immuuntherapieën (bijlage 1 en 2) wordt bepaald met behulp van statische berekeningen. Het aantal dieren dat nodig is voor de PK/PD studies (bijlage 3) is op basis van ervaring uit eerdere studies gekozen en tot een minimum beperkt. Het aantal benodigde dieren is gebaseerd op een realistische aanname betreffende het aantal middelen dat naar verwachting de komende vijf jaar getest zal gaan worden, de opzet van de studies en het geschat aantal dieren per proefgroep.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe. De uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren die goed aan mensen gewend zijn, de dieren zijn bovendien getraind om zo veel mogelijk mee te werken aan bepaalde diertechnische handelingen, waardoor ze minder stress van deze handelingen tijdens de experimenten zullen ervaren. Het aantal bloedafnames kan tot een minimum worden beperkt in geval reeds eerder geteste malaria stammen worden gebruikt, aangezien van deze stammen bekend is wanneer de parasieten in het bloed verschijnen. Sedatie wordt toegepast wanneer geïndiceerd. Bij onverwacht grotere welzijnsaantasting dan voorzien zal een humaan eindpunt worden toegepast.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. Bij PK/PD studies zullen de dieren in het overgrote deel van de studies in leven blijven aan het einde van het experiment. Bij de evaluatie van kandidaat vaccins en therapieën zal 70-80% van de dieren worden gedood voor het bestuderen van de weefsels. Een passende dodingsmethode zoals

vermeld in de richtlijn 2010/63/EU zal worden gebruikt om dieren te euthanaseren.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. Hergebruik is mogelijk, ook binnen dit project (mits er na infectie een tussenperiode van 6 maanden in acht wordt genomen). Hergebruik zal plaats vinden binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke criteria ten aanzien van de dierproef.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het verkrijgen van meer inzicht in de pathogenese van malaria, het verkrijgen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte, het testen van kandidaat vaccins en kandidaat therapieën op effectiviteit tegen malaria en het ongerief dat resus en Java apen en penseel aapjes in de beschreven proeven wordt aangedaan? Is het gebruik van deze niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen.

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

De waarden voor de samenleving zijn gelegen in het mogelijk verkrijgen van een vaccin dat bescherming geeft tegen infectie en nieuwe therapieën om malaria te genezen. Daarnaast kan met het beschikbaar komen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte een meer gerichte behandeling worden ontwikkeld, waardoor onnodig medicijn gebruik voorkomen wordt. De voordelen van het beschikbaar komen van een effectief vaccin of nieuwe medicijnen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn binnen de samenleving (minder zieken, minder doden). Bovendien wordt hierdoor de verspreiding van malaria voorkomen. Daarmee is dit onderzoek van groot belang.

De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de pathogenese van malaria en de rol van genetische factoren en het afweersysteem van de gastheer op verloop van de infectie en ziekte. Deze kennis kan mogelijk bijdragen aan de ontwikkeling van vaccins en betere therapieën tegen malaria. Aangezien er momenteel nog geen afdoend malariavaccin beschikbaar is en er resistentie optreedt tegen de huidig beschikbare medicijnen is deze kennis van groot belang.

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

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

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

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

   Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat de kennis omtrent pathogenese van malaria en de preklinische evaluatie van kandidaat vaccins en kandidaat therapieën belangrijk is voor het ontwikkelen van vaccins en effectieve medicijnen tegen malaria. Dit onderzoek kan tevens leiden tot het verkrijgen van biomerkers voor ziekteprogressie of bescherming tegen ziekte, hetgeen kan bijdragen aan het ontwikkelen van een beter op de patiënt afgestemde en effectievere behandeling.

   De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door het feit dat de gebruikte onderzoekmodellen voor een groot deel reeds zijn toegepast. De onderzoeker en het instituut bezitten de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor het verkrijgen van de benodigde malariaparasieten, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. Naar schatting 70 tot 80% van de dieren zal gedood worden aan het eind van de studie teneinde onderzoek aan de weefsels te kunnen doen.

   De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. De te gebruiken modellen voor *in vitro* analyses zijn deels binnen dit instituut opgezet en reeds eerder toegepast. Dit onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in NHP, aangezien alleen NHP gevoelig zijn voor deze voor de mens relevante vormen van malaria. De keuze voor resus apen, Java apen en penseel aapjes is toegespitst op de te beantwoorden vraagstelling en gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met specifieke malariaparasieten die sterk gelijken of identiek zijn aan de diverse bij de mens voorkomen parasieten. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoorten, de dieren zijn afkomstig uit eigen fok, de 3V-principes worden gehonoreerd door toepassing van ontwikkelde *in vitro* modellen, hergebruik van dieren, en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen (met behulp van positive reinforcement training). Het ongerief is maximaal matig maar kan ook tot licht beperkt blijven. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
    ☒ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
    ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
    ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
    ☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
    ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
    ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.

Centrale Commissie Dierproeven

16

Advies aan CCD

B

Datum 20 november 2018

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20186345

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

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

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

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

Bijlage 3.4.4.1: Alleen in de studies waarbij de biologische respons van de teststof op de hersenen en mogelijk andere organen onderzocht moet worden zullen de dieren aan het eind van een studie worden gedood. Geschat wordt dat dit om één studie binnen 5 jaar gaat.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

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

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

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
Maatschappij	11.1 [redacted]

2 DEC advies

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

te testen behandelmethodes zullen ook deels naar voren kunnen komen. Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

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

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

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

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

2. De waarde voor de te behandelen personen met de ziekte van Parkinson is gelegen in het mogelijk beschikbaar komen van effectieve behandelmethodes die verergering van de ziekte kunnen voorkomen of de symptomen kunnen verminderen. Tevens worden in deze aanvraag specifiek behandelmethodes tegen Parkinson dementie geëvalueerd en in geval van DBS geoptimaliseerd. Parkinson dementie is een onderzoeksdomein waar pas recentelijk aandacht voor ontstaan is. Het tegengaan van dementie en van de motorische en andere klinische verschijnselen kan een sterke verbetering van de kwaliteit van leven van de betrokken personen en verlichting voor de sociale omgeving inhouden. De voordelen voor de maatschappij zijn zowel economisch (jongere mensen met de ziekte van Parkinson kunnen langer aan het arbeidsproces blijven deelnemen, Parkinson patiënten in het algemeen zullen langer zelfstandig kunnen blijven, daardoor minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn van de samenleving (minder zieken, minder zorgkosten). Daarmee is dit onderzoek van groot belang.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze zullen ziek worden door de inductie van Parkinson of Parkinson dementie en zullen hinder ondervinden door verminderd motorisch en cognitief functioneren. Tevens zullen de dieren operatieve ingrepen ondergaan, voor injectie van een neurotoxine in de basale kern van Meynert, het aanbrengen van elektrodes en het aanbrengen van een transmitter voor telemetrische data acquisitie. Operaties vinden plaats onder anaesthesie. Perioperatief wordt pijnstilling toegepast en worden

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

De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de ontwikkeling van de ziekte van Parkinson en werkingswijze van mogelijke behandelmethodes. Tevens wordt inzicht verkregen in de mogelijkheden om de bij Parkinson dementie optredende cognitieve achteruitgang tegen te gaan. In het projectvoorstel staat ook als voorwaarde aangegeven dat de te testen behandelmethode moet bijdragen aan het wetenschappelijk inzicht in de ziekte en dat kan onder meer bereikt worden door de PET studies. Deze kennis is van groot belang voor de verdere ontwikkeling van een gerichtere behandeling van de ziekte.

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

3. De DEC concludeert dat de belangen van de samenleving als geheel en die van de patiënten in het bijzonder, welke in dit project worden nagestreefd zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.

Het onderzoek is van groot belang voor mensen, omdat het ontwikkelen van een effectief medicijn of behandeling met DBS tegen de verschijnselen van de ziekte van Parkinson en of de daarmee gepaard gaande dementie voor veel mensen een aanzienlijke verbetering van de kwaliteit van leven geeft.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door het feit dat de gebruikte onderzoekmodellen al eerder succesvol toegepast zijn door de onderzoeker in marmosets. Tevens wordt samengewerkt met ervaren neurochirurgen. De onderzoeker en het instituut bezitten de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor het in vivo testen van de effectiviteit van potentiele behandelmethodes, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De studie zal worden uitgevoerd in resus apen

(Macaca mulatta). De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor inductie van Parkinson met MPTP, de mogelijkheid om injecties uit te voeren en elektrodes te plaatsen in specifieke gebieden in het brein en geschiktheid voor gedragstesten. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. In dit diermodel kunnen ook eventuele nadelige effecten van nieuwe behandelmethodes aan het licht komen. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoort, de dieren zijn afkomstig uit eigen fok, de 3V-principes worden gehonoreerd door het toepassen van een klinische scoringstabel en het toepassen van telemetrie waardoor het aantal handelingen verminderd wordt, PET-CT om veranderingen in de hersenen over de tijd te kunnen volgen, zonder dat opofferen van het dier nodig is en training van dieren voor het meten van cognitie en andere gedragstesten. Het ongerief is maximaal matig. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven.

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

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij
- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd
De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over:
Aanvullende argumentatie omtrent de noodzaak om resus apen te gebruiken voor onderzoek naar het therapeutisch effect van DBS op de ziekte van Parkinson en Parkinson dementie, criteria waaraan kandidaat geneesmiddelen moeten voldoen om in aanmerking te komen voor evaluatie in dit diermodel en of er geen PK/PD studies nodig zou zijn om de juiste dosering en het toedieningsschema te bepalen, aanvullende informatie betreffende proefopzet, de opzet van het in het projectvoorstel vermelde pilot-experiment, de biotechnische handelingen en gedragstesten, de keuze om mannetjes te gebruiken voor onderzoek naar Parkinson dementie en het ongerief.

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

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

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Het valt ons wel op dat er meerdere termijnonderbrekingen geweest zijn. Dit is de kwaliteit van de aanvraag ten goede gekomen, maar wij willen u erop wijzen dat de rol van "meeschrijven" bij de IvD belegd is, en niet bij de DEC. De rol van de DEC is de adviseur van de CCD. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C-vragen.	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	Citaat: De ziekte van Parkinson is een ernstig invaliderende ziekte bij de mens waarvoor op dit moment slechts beperkte behandelingen beschikbaar zijn. Deze behandelingen bestrijden alleen de motorische symptomen en vertonen na verloop van tijd ernstige bijwerkingen. In dit project wordt daarom de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes tegen verschillende aspecten van de ziekte van Parkinson onderzocht in het resusaap Parkinsonmodel. Dit betreft de motorische symptomen, en Parkinson dementie waarbij in Parkinson patienten de cognitie is verstoord. [...] Er is een grote behoefte aan nieuwe farmacologische en niet-farmacologische behandelingen zoals medicijnen tegen PD en deep brain stimulatie als behandeling bij PDD. De resultaten van deze studies worden gebruikt voor selectie van kandidaat geneesmiddelen of voor de optimalisatie van behandelmethodes voor verdere klinische studies. Een potentieel nieuwe behandeling wordt alleen onderzocht in het aapmodel als in andere diermodellen geen ernstige bijwerkingen naar voren gekomen zijn en er aanwijzingen zijn dat de behandeling effectief kan zijn tegen de ziekte van Parkinson. Het concrete doel van dit project is selectie van nieuwe therapieën voor de ziekte van Parkinson en bijkomende aspecten zoals dementie voor verdere klinische studies. Het is de verwachting dat binnen de looptijd van dit project 3 nieuwe methoden onderzocht gaan worden. Het uiteindelijke doel van het onderzoek is dat behandelmethodes beschikbaar komen waarmee de symptomen van de ziekte van Parkinson voor de patiënt worden verlicht en de verdere achteruitgang wordt verminderd of voorkomen.
Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Citaat: Alleen al in Nederland leven ongeveer 32.000 mensen met de ziekte van Parkinson, dat is op dit moment 1 op de 500 mensen. Aangezien het een ouderdomsziekte is, wordt er op korte termijn een verdubbeling verwacht vanwege de vergrijzende samenleving. De ziekte treft vooral ouderen vanaf 55 jaar, die nog lang een bijdrage aan de maatschappij hadden kunnen leveren. Voor de Parkinsonpatiënt betekent dit een verminderde kwaliteit van leven met ernstige incapacitatie van beweging en complicaties zoals ernstige depressie, slaapverstoring, cognitieve achteruitgang, constipatie en incontinentie. Aangezien deze patiënten aangewezen zijn op de hulp van anderen beïnvloedt deze ziekte ook hun directe omgeving. Naarmate de ziekte vordert is zelfstandig wonen niet meer mogelijk maar is intensieve begeleiding noodzakelijk. De huidige therapieën die ontwikkeld zijn tegen de ziekte van Parkinson onderdrukken alleen de motorische symptomen. Aangezien de ziekte progressief is wordt de ernst van de symptomen alleen maar erger

	waardoor steeds meer medicatie nodig is voor hetzelfde effect. Hierdoor ontwikkelt zich tolerantie en bijwerkingen voor het medicijn en moet de patiënt tussendoor regelmatig overstappen op andere medicijnen. Omdat de ziekte een ernstig verslechterend verloop heeft en de incidentie door de groeiende vergrijzing toeneemt, is het belangrijk dat de ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen de ziekte van Parkinson blijft doorgaan. Het resusaap Parkinsonmodel draagt daaraan bij door enerzijds het testen van de effectiviteit van nieuwe behandelmethodes (maatschappelijk belang) maar anderzijds ook doordat onderzoek in het model informatie oplevert over het mechanisme wat ten grondslag ligt aan de ziekte (wetenschappelijk belang) en daarmee nieuwe aanknopingspunten voor behandeling gevonden kunnen worden. Bovendien kan met het onderzoek ook ongewenste nevenwerkingen van de behandeling worden ontdekt. Deze informatie is van belang voor het verdere traject van de behandelmethode voor klinisch gebruik. Verder is het onderzoek in de resusaap ook van belang voor het optimaliseren van DBS therapiëen. Dit geldt met name voor het behandelen van de cognitieve achteruitgang bij de ziekte van Parkinson (PDD). Ondanks eerdere positieve preklinische studies, blijkt er geen eenduidig effect op te treden binnen klinische trials/studies. Dit komt door een beperkte preklinische basis voor de translatie naar de kliniek [5]. De dierstudies zijn allen uitgevoerd met gezonde dieren zonder schade aan de NBM. Geen enkele studie heeft de relatie tussen de mate van cholinerge activatie na stimulatie van de NBM en de cognitieve verbetering laten zien. Tevens is er ook niet gekeken naar het stimulatie algoritme van de DBS in relatie tot het beoogde effect. Terwijl er aanwijzingen zijn dat het stimulatie patroon van groot belang is voor het effect. Een verkeerd gekozen stimulatie kan zelfs tot tegenovergestelde schadelijke effecten leiden. Daarom is het nodig om een stap terug te doen naar een preklinische studie om te onderzoeken wat het effect van verschillende stimulatie protocollen is. Dit kan niet in de mens omdat een verkeerd gekozen stimulatie een schadelijke uitwerking kan hebben. Bovendien, zal met het diermodel ook de ernst van de schade (vroege of late fase van de ziekte) in relatie tot het effect van de behandeling worden uitgezocht. Hierdoor kunnen in de toekomst patiënten geselecteert worden voor deze behandeling. Er is op dit moment geen inzicht in de relatie van slaagkans van NBM-DBS in relatie tot de ernst van het klinische beeld.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1

Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	Citaat uit DEC advies: De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn boven iedere twijfel verheven gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's. De onderzoeker heeft een grote expertise op het gebied van de ziekte van Parkinson en jarenlange ervaring met onderzoek naar deze ziekte en het evalueren van nieuwe therapieën in het marmoset MPTP model, inclusief het toepassen van geavanceerde uitleessystemen voor neurologische aandoeningen. Alhoewel er binnen het instituut nog niet eerder gewerkt is met het resus MPTP model is er veel ervaring met het gebruik van resus apen in biomedisch onderzoek en is dit model internationaal een veel toegepast en goed gevalideerd model. Dit onderzoek wordt uitgevoerd in samenwerking met ervaren neurochirurgen. 11.1 [redacted]

3V's

Vervanging	
	3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.: Citaat: In veel gevallen wordt een teststof door een externe partij aangeleverd om te testen in het resusaap Parkinson-model. Een therapie kan meteen in het resusaap Parkinson-model getest worden als er uit eerdere in vitro of in vivo studies met knaagdieren een indicatie is voor een te testen concentratie en toedieningsschema. De hieruit vastgestelde gegevens kunnen worden gebruikt voor een indicatie voor de dosis en het tijdstip voor het optimale effect van de stof in de resusaap. Echter wanneer dit niet voldoende informatie oplevert voor een therapie evaluatie in het Parkinson-model, dient er voorafgaand aan een therapie evaluatie (Bijlage 3) eerst een farmacokinetiek en/of dosisbepaling op relevante gedrags biomerkers in de gezonde resusaap gedaan te worden. Op dit moment zijn er geen in vitro modellen (zoals cellijnen, organoïds) beschikbaar voor het resusaap model om de opname, bio-beschikbaarheid etc. van de nieuwe middelen te onderzoeken.

	3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: Citaat: Deze haalbaarheidsstudie is bedoeld voor het optimaliseren en valideren van het MPTP model voor PD en van het saporine model voor PDD in de resusaap (bijlage 3). Daarom vervalt hier het mogelijk gebruik van in vitro methodes of onderzoek in knaagdieren. Het gebruik van het resusaapmodel bij Parkinson-onderzoek is veel toegepast en uitgebreid gevalideerd. Het gebruik van apen bij PD/PDD-onderzoek dient vooral als een preklinische evaluatie van nieuwe therapieën voordat klinische trials in patiënten worden gestart. Aangezien de resusaap een grote aapsoort is, is de resusaap geschikt voor het plaatsen van DBS-elektroden en het aanbrengen van lokale laesies in specifieke kleine hersenkernen.
	3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: Citaat: Door in vitro testen wordt een preselectie van effectieve geneesmiddelen gemaakt waardoor er zo min mogelijk dieren nodig zijn. Het nadeel van in vitro methoden is dat er geen interactie is met andere cellen en hersengebieden. Hiermee kan alleen het effect op een mechanisme in een cel getest worden en niet op de ziekte van Parkinson. Om de verstoorde interacties tussen hersengebieden te testen zijn we nog steeds afhankelijk van diermodellen. De ziekte van Parkinson wordt veroorzaakt door schade in de hersenen leidend tot functieverlies. De verstoring van de interactie tussen verschillende hersengebieden resulteert in de gedragsveranderingen. Met de huidige stand van de proefdiervrije alternatieven is het niet mogelijk deze complexe interactie en het effect van een behandeling op het gedrag buiten het levende dier te bestuderen. Het MPTP-inductie model voor de ziekte van Parkinson kan worden toegepast in verschillende diermodellen zoals de muis, de kat en de aap. Echter bij de kat verdwijnen spontaan de klinische symptomen en bij knaagdieren gebeurt dit zelfs al binnen twee dagen waardoor in deze diersoorten alleen post-mortem het effect kan worden aangetoond. Doordat de klinisch relevante Parkinson-symptomen niet spontaan verdwijnen in de aap-modellen voor de ziekte van Parkinson, is de aap geschikt om de progressie van het klinische beeld in tijd te volgen en belangrijk voor de voorspelling van de effecten van een behandeling in de kliniek. Als aap model wordt de marmosetaap, de cynomolgusaap en de resusaap gebruikt binnen dit onderzoeksveld. Het gebruik van het resusaapmodel bij Parkinson-onderzoek is veel toegepast en uitgebreid gevalideerd. Het gebruik van apen bij PD/PDD-onderzoek dient vooral als een preklinische evaluatie van nieuwe therapieën voordat klinische trials in patiënten worden gestart. Aangezien de resusaap een grotere aapsoort is dan de marmosetaap, is de resusaap geschikter voor het plaatsen van

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

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

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

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

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

	veranderingen optreden in gedrag dan wordt de veterinair hiervan op de hoogte gesteld om te beoordelen of ingrijpen nodig is om ongerief tot een minimum te beperken.
3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.: 11.1	
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: 11.1	
3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: 11.1	
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.: Citaat: Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1e van de Wet op de Dierproeven.	
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.: Citaat: Dieren die zullen worden gebruikt in de experimenten, zijn mogelijk gebruikt in eerdere studies. Gezien de lange levensduur van deze species zal hergebruik plaatsvinden binnen de wettelijke kaders beschreven in art. 1e van de Wet op de Dierproeven. Van belang is wel dat er géén eerdere ingrepen hebben plaatsgevonden met een blijvend effect die het gedrag of de motorfunctie beïnvloedt of die een invloed hebben op het functioneren van de hersenen.	
3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel: Zie bijlage 3.4.4.2.	

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

Naam proef		

3.4.4.1 Bepaling van farmacokinetiek en dosis van nieuwe therapieën op relevante gedrags biomerkers in gezonde resusapen.	HEP: <1%	Citaat: Over het algemeen zijn er geen ernstige effecten te verwachten bij een farmacokinetiek en dosisbepaling. In geval een dier onverwacht ernstig ziek wordt en niet behandeld kan worden, dan zal dit als eindpunt gelden en wordt het dier gedood. In dat geval zal het ongerief maximaal matig zijn.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	
3.4.4.2 Haalbaarheidsstudie van het resusaap Parkinsonmodel.	HEP: <5%	Citaat: Indien een dier ernstig gewichtsverlies (>15% van het lichaamsgewicht), of ziekteverschijnselen (zoals braken of diarree) gaat vertonen zal in overleg met de veterinair worden besloten of behandeling nodig is of dat het dier uit de studie gehaald wordt. In geval van ernstige ziekteverschijnselen zal een dier direct uit studie worden genomen en geëuthanaseerd (gevolgd door uitgebreide sectie) om verder ongerief te voorkomen. Dit vindt plaats wanneer het eindpunt volgens de klinische score* is bereikt waarbij de maximale gemiddelde cumulatieve score >3,5 is voor tenminste twee achtereenvolgende dagen, of wanneer het algemene welzijn door andere omstandigheden ernstig wordt aangetast. Anders worden de dieren geeuthaniseerd op het eindpunt van de studie. De humane eindpunten voorkomen dat matig ongerief ernstig wordt en daarom is er geen ernstig ongerief in deze dierproef. * De klinische score is zowel belangrijk als uitkomstparameter tijdens de studie als voor het bepalen van het humane eindpunt. Klinische score omvat o.a. verminderd vachtonderhoud (poetsgedrag), apathie (interesse in de omgeving), immobiliteit, alertheid, tremoractiviteit. Deze symptomen worden gescoord op een schaal van 0 (niet waargenomen), 1 (waargenomen maar onderdeel van normaal gedrag), 2 (waargenomen in een lichte vorm), 3 (duidelijk waargenomen), en 4 (waargenomen in een ernstige vorm).
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	

3.4.4.3 Therapie evaluatie in het resusaap Parkinsonmodel	HEP: <5 %	Citaat: Indien een dier ernstig gewichtsverlies (>15% van het lichaamsgewicht), of ziekteverschijnselen (zoals braken of diarree) gaat vertonen zal in overleg met de veterinair worden besloten of behandeling nodig is of dat het dier uit de studie gehaald wordt. In geval van ernstige ziekteverschijnselen zal een dier direct uit studie worden genomen en geëuthanaseerd (gevolgd door uitgebreide sectie) om verder ongerief te voorkomen. Dit vindt plaats wanneer het eindpunt volgens de klinische score* is bereikt waarbij de maximale gemiddelde cumulatieve score >3,5 is voor tenminste twee achtereenvolgende dagen, of wanneer het algemene welzijn door andere omstandigheden ernstig wordt aangetast. Anders worden de dieren geeuthaniseerd op het eindpunt van de studie. De humane eindpunten voorkomen dat matig ongerief ernstig wordt en daarom is er geen ernstig ongerief in deze dierproef. * De klinische score is zowel belangrijk als uitkomstparameter tijdens de studie als voor het bepalen van het humane eindpunt. Klinische score omvat o.a. verminderd vachtonderhoud (poetsgedrag), apathie (interesse in de omgeving), immobiliteit, alertheid, tremoractiviteit. Deze symptomen worden gescoord op een schaal van 0 (niet waargenomen), 1 (waargenomen maar onderdeel van normaal gedrag), 2 (waargenomen in een lichte vorm), 3 (duidelijk waargenomen), en 4 (waargenomen in een ernstige vorm).
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

De aanvraag bevat voldoende informatie over de doelstelling, het belang, de strategie en de humane eindpunten om tot een oordeel te komen.

De aanvrager is nog gevraagd uit te leggen of voordat de proeven in bijlage 3.4.4.1 worden ingezet, gebruik is gemaakt van in silico modeling. 11.1 [redacted]

Er wordt gebruik gemaakt van rhesusapen. De noodzaak voor het gebruik van niet-humane primaten is op meerdere punten in de aanvraag beschreven, en

goed onderbouwd (zie ook citaat C9 uit DEC advies voor samenvatting). Ook is beschreven waarom specifiek voor de rhesusaap is gekozen. De DEC vindt dit voldoende onderbouwd. 11.1

In het onderzoek naar Parkinson dementie wordt de voorkeur voor het gebruik van mannelijke apen beschreven, vanwege de gevoeligheid van cognitie voor oestrogeen. De DEC vindt deze onderbouwing voldoende. De aanvrager wordt gevraagd aanvullend te onderbouwen waarom hier in dit geval niet voor gekozen is.

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

In Bijlage 3.4.4.2 en 3.4.4.3 worden de gedragstesten erg algemeen omschreven. Het is niet duidelijk welke gedragstesten zullen worden ingezet, en hoe vaak de individuele dieren aan deze gedragstesten zullen worden onderworpen. De aanvrager is nog gevraagd dit nader te beschrijven.

De NTS is vrij moeilijk beschreven, en de handelingen aan de dieren en bijbehorende effecten van de handelingen worden onvoldoende beschreven. Aanvrager is nog gevraagd de NTS op deze punten aan te passen.

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

17

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020186346
Bijlagen
1

Datum 6 november 2018
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

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

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

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 6 november 2018 tot en met 31 oktober 2023.
De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

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

Nadere vragen aanvrager
Op 26 oktober 2018 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op eventuele overlap met eerder afgegeven vergunningen en de optimalisatie van het marmoset model. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen
Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

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

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

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

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

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

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

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

Datum:
6 november 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020186346

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

i.o.
10.2.g [redacted]

Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 6 november 2018 tot en met 31 oktober 2023, voor het project "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development" met aanvraagnummer AVD5020020186346, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Senior Scientist.
Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 30 augustus 2018
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
   a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 1 oktober 2018;
   b Bijlagen dierproeven
      - 3.4.4.1. Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in macaque models relevant to human malaria, zoals ontvangen op 1 oktober 2018;
      - 3.4.4.2. Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in marmoset models relevant to human malaria, zoals ontvangen op 1 oktober 2018;
      - 3.4.4.3. PK/PD studies in rhesus macaques, zoals ontvangen op 1 oktober 2018;
   c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 1 oktober 2018;
   d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 1 oktober 2018
   e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 30 oktober 2018.

Aanvraagnummer:
AVD5020020186346

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1. Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in macaque models relevant to human malaria			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	85	50,0% Matig 50,0% Licht
	Java-apen (Macaca fascicularis)	40	50,0% Matig 50,0% Licht
3.4.4.2. Study of disease mechanisms and the efficacy of new therapies in marmoset models relevant to human malaria			
	Klauwaapjes (bijv. Callithrix jacchus)	48	20,0% Matig 80,0% Licht
3.4.4.3. PK/PD studies in rhesus macaques			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	15	100,0% Matig

Voorwaarden

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

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

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of

door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD5020020186346

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen
Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging
De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.
In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

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

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

Einde van een dierproef
Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.
Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.
Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.
In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD5020020186346

Uw referentie

Bijlagen

Datum 13 november 2018
Betreft Correctie beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte 10.2.e
Op 30 augustus 2018 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Infection of macaques with malaria parasites to provide parasites for studies that support malaria drug/vaccine development" met aanvraagnummer AVD5020020186346.

Beslissing
Op 6 november 2018 hebben wij u de beschikking en vergunning van uw aanvraag toegezonden. Op 13 november 2018 heeft de contactpersoon contact met ons opgenomen, omdat de titel van het project en de datum waarop de beoordeling achteraf moet worden ingediend niet correct zijn.

De in de vergunning genoemde projecttitel komt overeen met de titel op het originele aanvraagformulier. Op uw verzoek wordt de titel van het project gewijzigd naar de titel genoemd in het projectvoorstel: "Study of parasite host-interactions and efficacy of new treatment methods in non-human primate malaria models relevant to human malaria infection."

De in de vergunning genoemde datum voor indienen van de beoordeling achteraf is een kennelijke verschrijving en kan gecorrigeerd worden naar oktober 2024.

Voor het overige blijft het besluit van 6 november 2018 ongewijzigd.
Deze brief dient u bij uw vergunning te voegen.

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

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige

voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

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

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:
10.2.g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Inventaris Wob-verzoek W21-04									
	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
document NTS20197924	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 origineel				x				x	
4.Bijlage dierproeven origineel			x						
5.Ontvangstbevestiging				x		x		x	
6.projectvoorstel herzien				x				x	
7.bijlage dierproeven herzien			x						
8.DEC advies				x		x		x	
9.aanvullende vragen				x		x			
10.reactie op vragen				x		x			
11.Adviesnota CCD				x		x			x
12.Beschikking en vergunning				x		x		x	

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

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

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1350 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

☐ Via een eenmalige incasso

X Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☒ Melding Machtiging

☒ 1bijlage

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	10.2.e
Functie	10.2.g
Plaats	Rijswijk
Datum	02 - 05 - 2019
Handtekening	10.2.g

Centrale Commissie Dierproeven

2

Format
Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

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)

Ons afweersysteem zorgt ervoor dat ziekteverwekkers tijdig door het lichaam worden herkend en worden opgeruimd. Een belangrijke eigenschap van het afweersysteem is dat het onderscheid kan maken tussen lichaamseigen en lichaamsvreemde moleculen, zodat alleen een afweerreactie plaatsvindt tegen ziekteverwekkers maar niet tegen lichaamseigen moleculen. Soms treedt echter toch een reactie op tegen lichaamseigen moleculen, hetgeen kan leiden tot auto-immuunziektes, zoals bijvoorbeeld multiple sclerose (MS), reumatoïde

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

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

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

3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	In dit project zal worden bepaald in hoeverre de te testen geneesmiddelen de gewenste vermeerdering en activering van afweer onderdrukkende immuun-cellen bewerkstelligen en wordt inzicht verkregen in mogelijke bijwerkingen, zoals ongewenst vrijkomen van ontstekingsgerichte stoffen. De bijdrage aan het maatschappelijk belang is dat op deze manier een therapie beschikbaar zou kunnen komen die kan worden ingezet bij de behandeling van auto-immuunziektes en transplantatie. Betere behandeling kan leiden tot besparing in de ziektekosten en verbetering van de kwaliteit van leven. De resultaten van deze studies zullen worden gepubliceerd in internationale wetenschappelijke tijdschriften.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	In drie jaar tijd maximaal 30 makaken.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De dieren zullen stress ondervinden ten gevolge van biotechnische handelingen en ongerief ten gevolge van de frequente bloedafnames. Eventuele bijwerkingen zullen worden behandeld.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Matig
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Een deel van de dieren zal mogelijk aan het einde van de studie op humane wijze gedood worden om onderzoek aan de organen te kunnen doen.

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

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Centrale Commissie Dierproeven

3

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate research Centre
1.3	Provide the title of the project.	Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immuno-therapeutics aimed to induce regulatory T-cells.

2 Categories

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

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2 Purpose

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

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

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

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

3.3 Relevance

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

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

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

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

1. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. Nat Rev Immunol. 2012;12(3):180-90. 10.1038/nri3156
2. Sharabi A, Tsokos MG, Ding Y, Malek TR, Klatzmann D, Tsokos GC. Regulatory T cells in the treatment of disease. Nat Rev Drug Discov. 2018. 10.1038/nrd.2018.148
3. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet. 2001;27(1):68-73. 10.1038/83784
4. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol. 2003;4(4):330-6. 10.1038/ni904
5. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. Nat Genet. 2001;27(1):18-20. 10.1038/83707
6. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet. 2001;27(1):20-1. 10.1038/83713
7. Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. Nat Rev Immunol. 2015;15(5):283-94. 10.1038/nri3823
8. Humrich JY, von Spee-Mayer C, Siegert E, Alexander T, Hiepe F, Radbruch A, et al. Rapid induction of clinical remission by low-dose interleukin-2 in a patient with refractory SLE. Ann Rheum Dis. 2015;74(4):791-2. 10.1136/annrheumdis-2014-206506
9. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, 3rd, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. N Engl J Med. 2011;365(22):2055-66. 10.1056/NEJMoa1108188
10. Saadoun D, Rosenzwajg M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. N Engl J Med. 2011;365(22):2067-77. 10.1056/NEJMoa1105143
11. Rosenzwajg M, Churlaud G, Mallone R, Six A, Derian N, Chaara W, et al. Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. J Autoimmun. 2015;58:48-58. 10.1016/j.jaut.2015.01.001
12. Rosenzwajg M, Lorenzon R, Cacoub P, Pham HP, Pitoiset F, El Soufi K, et al. Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial. Ann Rheum Dis. 2019;78(2):209-17. 10.1136/annrheumdis-2018-214229
13. Baker KF, Isaacs JD. Novel therapies for immune-mediated inflammatory diseases: What can we learn from their use in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis? Ann Rheum Dis. 2018;77(2):175-87. 10.1136/annrheumdis-2017-211555
14. 10.2.g [redacted]
17. Brennan FR, Cauvin A, Tibbitts J, Wolfreys A. Optimized nonclinical safety assessment strategies supporting clinical development of therapeutic monoclonal antibodies targeting inflammatory diseases. Drug Dev Res. 2014;75(3):115-61. 10.1002/ddr.21173

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

10.2.g

3.4 Research strategy

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

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

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

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

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

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

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

The proposal uses only one type of study.

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

4

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre	
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number	Type of animal procedure
		1	DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

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

Criteria to select candidates for testing are:

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

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

The primary outcome parameters are:

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

The secondary outcome parameters are:

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

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

The therapeutic agent will be injected either subcutaneously, intramuscularly or intravenously depending on the nature of the compound. Local reactions will be recorded in case of subcutaneous and intramuscular injection. The compound is either given once or multiple times using at least a 1 day interval, with a maximum number of 10 injections. Blood is taken at multiple time points on the day of injection for PK analysis. Subsequently, blood is taken at regular time intervals for PK/PD analysis, cytokine analysis and clinical chemistry and hematology (as described above). In general, blood volumes to be taken will not exceed a maximum of 1% of the body weight per 4 weeks (and 0.7% max per bleeding). Injections and blood draw will be performed under sedation. In case a daily blood draw is required then the animals will receive tube feeding to supplement food intake, which is otherwise reduced because of fasting before sedation. The animals will be monitored for general behavior as well as specific signs for anaphylaxis, including alertness, posture, dehydration, nausea, breathing pattern, temperature increase. A clinical scoring system will be prepared and applied based on these symptoms and used as clinical end-point. At the end of the study, animals will either return to the experimental stock or are humanely euthanized in case full pathology assessment is required.

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

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

B. The animals

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

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

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

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

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals to be used in these experiments may have been used in other studies, provided that they did not previously receive immunosuppressive therapy or mAb administration. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal framework described in art. 1 of the law on animal testing.

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement.

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

Reduction.

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

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

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for enrichment in our institute.
All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database thus facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relief the pain, if necessary. Appropriate measures will be taken in case clinical symptoms indicative of vascular leakage syndrome are observed in order to minimize discomfort.
In case a daily blood draw is required then the animals will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.
Regular analysis of haematological and clinical chemistry parameters is part of the experiment. If necessary, judged by the veterinarian, measures will then be taken to treat the animal.
The studies will be performed according the guidelines of the "Wet Milieubeheer", and will cause no adverse effects on the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

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

Explain why these effects may emerge.

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

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

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

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

Indicate the likely incidence.

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

K. Classification of severity of procedures

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

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

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

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

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

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

☒ Yes

Centrale Commissie Dierproeven

5

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020197924
Bijlagen
2

Datum 6 mei 2019
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

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

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

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

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

Datum:
6 mei 2019
Aanvraagnummer:
AVD5020020197924

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
6 mei 2019
Aanvraagnummer:
AVD5020020197924

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:	Section head Cell Mediated Immunity
Afdeling:	Virology
Telefoonnummer:	
E-mailadres:	10.2.e

Datum:
6 mei 2019
Aanvraagnummer:
AVD5020020197924

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	10.2.e
Functie:	Section head Immunopathology
Afdeling:	Virology
Telefoonnummer:	
E-mailadres:	10.2.e

Over uw aanvraag

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

Over uw project

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

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

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

Datum:
6 mei 2019
Aanvraagnummer:
AVD5020020197924

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

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

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020197924
Bijlagen
2

Datum 6 mei 2019
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

6

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate research Centre
1.3	Provide the title of the project.	Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immuno-therapeutics aimed to induce regulatory T-cells.

2 Categories

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

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

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

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

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

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

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

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

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

problem after prolonged use. However, an immediate strong release of inflammatory cytokines can be induced by unexpected interactions of the therapeutic mAb with immune-effector cells or via triggering of innate immune cells, such as natural killer (NK) cells and phagocytic cells, or complement, through Fc Receptor (FcR) interactions (17). The ensuing cytokine release syndrome can lead to systemic organ failure and result in death, as observed in a phase I clinical trial where the CD28 superagonist mAb TGN1412, targeted for use against RA, was tested (18). Cytokine release syndromes have also been recorded in mAb therapies targeting CD3, expressed on T-cells, and during IL-2 cytokine therapy (1).
The potential risks associated with mAb immune-therapy in general and T_{REG} inducing mAb therapy in particular, has implications for the pre-clinical evaluation of these therapies. Special emphasis has to be put on the effect on the activation and proliferation as well as function of different immune cell populations. In addition, potential triggering of a cytokine release syndrome has to be considered. This requires testing in suitable *in vitro* and *in vivo* animal models (17). Extensive *in vitro* studies involving immunopharmacology on the appropriate cell types and tissue cross-reactivity studies need to be followed by studies in appropriate animal species. Differences in target molecule sequence homology, expression pattern and function as well as the use of human or humanized mAb precludes the use of many rodent species and makes it necessary to use non-human primates, such as macaque species, that are more closely related to humans. In addition, the much closer similarity in FcγR expression and innate effector function, which are essential to study FcR mediated adverse events associated with the use of mAb therapy, and homology in immunoglobulin genes (important for studying induction of Ab responses to the therapeutic mAb) makes the use of non-human primates pivotal (19-23). While other species can be used to obtain proof of principle by testing surrogate mAb binding to a homologous target, non-human primates are considered the only relevant species for dose range-finding (DRF) and pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) evaluation before clinical trials can start (17).

3.2 Purpose

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

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

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

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

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

3.3 Relevance

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

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

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

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

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

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

3.4 Research strategy

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

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

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

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

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

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

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

The proposal uses only one type of study.

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

7

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50200
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 1 — Type of animal procedure: DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

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

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

The primary outcome parameters are:

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

The secondary outcome parameters are:

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

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

The therapeutic agent will be injected either subcutaneously, intramuscularly or intravenously depending on the nature of the compound. Local reactions will be recorded in case of subcutaneous and intramuscular injection. The compound is either given once or multiple times using at least a 1 day interval, with a maximum number of 10 injections. Blood is taken at multiple time points on the day of injection for PK analysis. Subsequently, blood is taken at regular time intervals for PK/PD analysis, cytokine analysis and clinical chemistry and hematology (as described above). In general, blood volumes to be taken will not exceed a maximum of 1% of the body weight per 4 weeks (and 0.7% max per bleeding). Injections and blood draw will be performed under sedation. In case a daily blood draw is required then the animals will receive tube feeding to supplement food intake, which is otherwise reduced because of fasting before sedation. The animals will be monitored for general behavior as well as specific signs for anaphylaxis, including alertness, posture, dehydration, nausea, breathing pattern, temperature increase. A clinical scoring system will be prepared and applied based on these symptoms and used as clinical end-point. At the end of the study, animals will either return to the experimental stock or are humanely euthanized in case full pathology assessment is required.

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

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

B. The animals

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

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

are specifically designed to bind human target molecules. Furthermore, the similarity in the cellular composition and functional characteristics of the immune system and physiological responses allows adequate evaluation of PK, desired therapeutic effects as well as potential adverse events.
It is expected that at most four different compounds need to be tested, using two to three doses, with three animals per group. The aim is to test two compounds simultaneously, which makes it possible to share a common vehicle control group. Each study is performed either with all male or all female animals. This is needed because of the known difference in prevalence of autoimmune diseases and the reported difference in percentage of T_{REG} between males and females (1). Typically, a study is comprised of 2 dose groups x 2 test compounds + 1 control group = 5 groups. With 3 animals per group this results in 15 animals per experiment. We expect to perform two experiments over a three-year period (testing 4 new compounds in total); i.e. 30 animals in total.

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

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☐ No, continue with question D.

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

Animals to be used in these experiments may have been used in other studies, provided that they did not previously receive immunosuppressive therapy or mAb administration. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal framework described in art. 1 of the law on animal testing.

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

☒ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement.

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

Reduction.

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

animals per group needed to effectively determine PK/PD characteristics and monitor for inadvertent general immune activation is three animals. Furthermore, we aim to evaluate different doses at the same time and to include more than one candidate therapeutic, so that a single control group can be used. The control group is needed to correct for effects induced by the vehicle or by the sedation alone.
Refinement.
Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via gavage) when animals need to be daily sedated for blood sampling. The gavage is given during the sedation for a maximum period of five days. This reduces the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving sedation. The number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum. All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, a standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of vascular leakage syndrome (e.g. dehydration, nausea, breathing pattern, temperature increase).

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for enrichment in our institute.
All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database thus facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relief the pain, if necessary. Appropriate measures will be taken in case clinical symptoms indicative of vascular leakage syndrome are observed in order to minimize discomfort.
In case a daily blood draw is required then the animals will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.
Regular analysis of haematological and clinical chemistry parameters is part of the experiment. If necessary, judged by the veterinarian, measures will then be taken to treat the animal.
The studies will be performed according the guidelines of the "Wet Milieubeheer", and will cause no adverse effects on the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

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

Explain why these effects may emerge.

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

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

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

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

Indicate the likely incidence.

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

K. Classification of severity of procedures

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

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

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

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

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

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

☒ Yes

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD5020020197924

2. Titel van het project: Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immune-therapeutics aimed to induce regulatory T-cells.

3. Titel van de NTS: Het pre-klinisch testen in makaken van nieuwe geneesmiddelen voor het vermeerderen en activeren van immuun-cellen die een schadelijke afweerreactie onderdrukken.

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

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

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☒ ontvangen door DEC: 08-05-2019
   - ☒ aanvraag compleet: 08-05-2019.
   - ☒ in vergadering besproken: 15-05-2019
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☒ termijnonderbreking(en) van 15-05-2019 tot 20-05-2019
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☒ aanpassing aanvraag: 20-05-2019
   - ☒ advies aan CCD: 28-05-2019

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

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

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

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

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum:
   - Gestelde vraag/vragen: wat verduidelijkingen in de tekst en een vraag over de duur van de follow-up na de laatste toediening van de teststof
   - Datum antwoord: 20-05-2019
   - Verstrekt(e) antwoord(en): duur van de follow-up is aangegeven, tekstuele veranderingen zijn doorgevoerd.
   - De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen onderzoek naar immunologie, statistische analyse, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming.

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Een van de DEC-leden was betrokken bij de aanvraag en heeft zich tijdens bespreking ervan uit de vergadering teruggetrokken.

C. Beoordeling (inhoud)

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

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

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorie, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek', sluit aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag worden nieuwe biologicals onderzocht op hun kinetische eigenschappen en hun vermogen om ongewenste immuunreacties te onderdrukken/reguleren. Deze kennis kan mogelijk worden toegepast bij de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen auto-immuunziekten of voor het reguleren van afstoting bij orgaantransplantatie.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Het directe doel van dit experiment is het testen van middelen die selectief regulatoire T-cellen vermeerderen en activeren om te monitoren wat de korte termijn gevolgen daarvan zijn op met name het immuunsysteem in makaken. Het uiteindelijke doel is om deze middelen te gaan toedienen aan mensen met een auto-immuunziekte of na orgaantransplantatie zodat ongewenste immuunreacties beter beheerst worden. Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld).* De belangrijkste belanghebbenden in dit project, dat gericht is op moduleren van immuunrespons, zijn: het onderzoeksveld, de proefdieren en de te behandelen patiënten.

   Voor het onderzoeksveld is het verkrijgen van nieuwe kennis over regulatie van immuunresponsen van belang. Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s).

   Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen middelen toegediend krijgen waardoor het immuunsysteem verandert en mogelijk aangetast wordt, ze zullen zo vaak als voor de uitvoering van de proeven noodzakelijk wordt geacht gesedeerd worden voor bloedafnames en een aantal dieren zal worden ge-euthanaseerd.

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

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

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep is evident gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's. Immunologie is een speerpunt van de onderzoekinstelling.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. Een harde voorwaarde voor testen van kandidaat geneesmiddelen is succesvol voorafgaand *in vitro* onderzoek en onderzoek in knaagdieren van vergelijkbare moleculen die kunnen aangrijpen op knaagdiercellen. Preliminaire data uit klinische trials met vergelijkbare middelen geven hoopgevende resultaten. Echter deze middelen zijn kortwerkend en een nieuwe aanpak is vereist om langdurige effecten op het immuunsysteem te verkrijgen.

Welzijn dieren

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

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

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de overeenkomst in zowel het target molecuul van het therapeutisch agens dat getest moet worden als het immuunsysteem tussen makaken en mensen. De biologicals hebben een diersoort specifieke werking en de muizen-equivalent van deze stoffen is niet werkzaam bij primaten. De overeenkomst tussen de immuunsystemen van makaken en mensen is zodanig dat mogelijke positieve en negatieve effecten van behandeling met de menselijke varianten van het biological alleen onderzocht kunnen worden in niet-humane primaten en ook voor het bepalen van de dosering die veilig is in mensen is het gebruik van primaten essentieel.
Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt, tenzij het immuunsysteem door voorgaande behandelingen is gemodificeerd.

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

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Dieren zullen op gepaste wijze verzorgd en gehuisvest worden, voldoend aan de wettelijke richtlijnen.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief is correct als matig ingeschat. Die dieren worden regelmatig gesedeerd voor toediening van de teststof en/of bloedafnames. Door geven van sondevoeding wordt het dierenwelzijn rondom de experimenten gewaarborgd. De effecten van de teststoffen leiden naar verwachting niet tot significant extra ongerief.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de dieren te behandelen met geneesmiddelen die het immuunsysteem kunnen aantasten, door herhaalde sedaties en ook omdat een deel van de dieren zal worden ge-euthanaseerd.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe. De humane eindpunten zijn goed gedefinieerd en de criteria worden gehanteerd op basis van een op de studie gerichte klinische scoringslijst.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. In dit project worden middelen getest die erop gericht zijn een specifiek deel van het immuunsysteem te beïnvloeden. Het immuunsysteem is een complex geheel dat nog niet *in vitro* na te bootsen is en om een goed beeld te krijgen van de effecten van deze middelen; de beoogde en de negatieve effecten van deze middelen op het gehele immuunsysteem dienen in een intact dier te worden onderzocht dat qua immuunsysteem zo veel mogelijk op de mens lijkt.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe. Het aantal benodigde dieren wordt realistisch ingeschat. Er worden maximaal 4 middelen getest in 2 tot 3 doseringen per experiment, waarbij onbehandelde controlegroepen zo veel mogelijk tussen proefopzetten worden gedeeld. De groepsgrootte van drie dieren per groep is statistisch onderbouwd.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe. Dieren worden tijdens de eerste fase van de studie waarin ze vaak onder narcose moeten voor bloedsampling en toediening van de teststof bijgevoerd mbv sondevoeding. Bloedafnames en de volumina van bloedafnames worden tot een minimum beperkt. Hematologische en klinisch chemische parameters worden regelmatig bepaald en beoordeeld door een ervaren dierenarts. Dieren worden gedurende de gehele studie gemonitord door ervaren dierverzorgers en een klinische scorelijst wordt bijgehouden waarin de

gezondheid van het dier wordt gerapporteerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. N.v.t., het betreft geen wettelijk vereiste testen en de instelling is betrokken vanwege unieke immunologische expertise en methoden m.b.t. deze diersoorten.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. Een deel van de dieren zal na afloop van het experiment worden gedood om het effect van de behandeling op organen te evalueren. Euthanasie wordt uitgevoerd volgens de richtlijnen.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. De dieren die niet gedood worden in het kader van de proef blijven bij de instelling en komen in aanmerking voor hergebruik.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het testen van mogelijke nieuwe immuunsysteem-regulerende medicijnen het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten en het hen aangedane ongerief in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

De waarde voor het onderzoeksveld is vooral gelegen in de identificatie van nieuwe medicijnen die gericht en specifiek de werking van het immuunsysteem kunnen veranderen/reguleren. Als de experimenten succesvol worden afgerond zal er vervolgonderzoek plaatsvinden, onder andere naar werkzaamheid bij relevante ziektebeelden en naar de toepasbaarheid bij mensen. Dit onderzoek vormt een noodzakelijke stap daarheen en is mede bepalend voor eventuele verdere stappen.

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

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

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

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

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

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

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat.
Dit onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in makaken, aangezien deze dieren beter vergelijkbaar zijn met de mens dan andere diermodellen. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoorten, de dieren zijn afkomstig uit eigen fok, de 3V-principes worden gehonoreerd door toepassing van sedatie, het voortdurend monitoren van de dieren, het delen van controlegroepen en hergebruik van dieren. Het ongerief wordt veroorzaakt door de sedaties, toediening van de teststof, herhaalde bloedafnames en mogelijke veranderingen in het immuunsysteem.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
   - ▯ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
     - ▯ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
     - ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
     - ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
     - ☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
     - ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
     - ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.

9

10.2.e

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

Geachte 10.2.e
Op 3 mei 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immunotherapeutics aimed to induce regulatory T-cells" met aanvraagnummer AVD5020020197924. Hoewel wij het DEC advies reeds op 28 mei hebben ontvangen, is uw aanvraag niet in voorgaande CCD vergadering besproken. De reden hiervoor was dat het ons niet gelukt is om alle aanvragen in de vorige CCD vergadering in te brengen. De keuzes die wij dan maken zijn met name gebaseerd op de doorlooptijden van de lopende vergunningaanvragen.

In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

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

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

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

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

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

Met vriendelijke groet,

10.2.e

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

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

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

Vragen omtrent aanvraag projectvergunning dierproeven AVD5020020197924
Datum: 1 juli 2019

Geachte leden van de CCD,

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

11

Advies aan CCD

B

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

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

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

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

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

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

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

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

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
Maatschappij	11.1

2 DEC advies

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

Citaat:
1. Rechtvaardigt het testen van mogelijke nieuwe immuunsysteem-regulerende medicijnen het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten en het hen aangedane ongerief in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren of andere onderzoeksmodellen?

2. De waarde voor het onderzoeksveld is vooral gelegen in de identificatie van nieuwe medicijnen die gericht en specifiek de werking van het immuunsysteem kunnen veranderen/reguleren. Als de experimenten succesvol worden afgerond zal er vervolgonderzoek plaatsvinden, onder andere naar werkzaamheid bij relevante ziektebeelden en naar de toepasbaarheid bij mensen. Dit onderzoek vormt een noodzakelijke stap daarheen en is mede bepalend voor eventuele verdere stappen.

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

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

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

Het onderzoek is op langere termijn van groot belang voor mensen, omdat het dringend nodig is om betere middelen met minder bijwerkingen tegen auto-immuunziekten te ontwikkelen en de uitkomst van orgaantransplantatie te verbeteren.

	De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door langdurige ervaring in het werken met niet-humane primaten als proefdier. De aanvrager heeft aantoonbare kundigheid betreffende het opzetten van dierproeven, de analyse van kleine volumina bloedsamples en de werking van het immuunsysteem van niet-humane primaten. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op fysiologische en moleculaire gelijkenissen tussen mensen en makaken wat betreft de targetmoleculen en de opbouw van het immuunsysteem. De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. Dit onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in makaken, aangezien deze dieren beter vergelijkbaar zijn met de mens dan andere diermodellen. Het belang van het onderzoek rechtvaardigt het gebruik van deze diersoorten, de dieren zijn afkomstig uit eigen fok, de 3V-principes worden gehonoreerd door toepassing van sedatie, het voortdurend monitoren van de dieren, het delen van controlegroepen en hergebruik van dieren. Het ongerief wordt veroorzaakt door de sedaties, toediening van de teststof, herhaalde bloedafnames en mogelijke veranderingen in het immuunsysteem. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het voorgestelde gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt. De DEC heeft extern advies ingewonnen bij - de aanvrager is om aanvullingen gevraagd De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over: wat verduidelijkingen in de tekst en een vraag over de duur van de follow-up na de laatste toediening van de teststof Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. Een van de DEC-leden was betrokken bij de aanvraag en heeft zich tijdens bespreking ervan uit de vergadering teruggetrokken.
Het DEC advies is helder en navolgbaar. Er is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de C-vragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. Bij vraag C18 geeft u aan dat in onderhavige projectaanvraag dieren van beide geslachten worden gebruikt. U zegt hierbij niet dat voor elk experiment slechts 1 van de geslachten wordt ingezet en wat daarover uw mening is. De CCD had graag gezien dat u het meermaals vasten van de dieren voor de sedatie wat uitgebreider had benoemd/gewogen in uw advies, zowel bij de ongeriefsclassificatie (C11; u benoemt het hier indirect al wel) als bij afwijkende huisvesting (C9). De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C-vragen. U heeft in uw advies een voorwaarde voorgesteld (beoordeling achteraf). De voorgestelde voorwaarde volgt op een logische wijze uit uw advies.	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	Citaat: The ultimate goal of this project proposal is to obtain a new therapeutic method, based on the in vivo amplification and activation of regulatory T-cells, that can be used for treatment of autoimmune diseases, such as type I diabetes (T1D), multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), myasthenia gravis (MG), systemic lupus erythematosus (SLE), ankylosing spondylitis (AS), psoriasis and against organ rejection in transplantation. The direct aim is to evaluate a newly developed humanised anti-human IL-2 monoclonal antibody (mAb) in combination with recombinant human IL-2, forming TREG-biased IL-2/anti-IL-2 mAb complexes (briefly IL-2 complexes), for their potential to selectively activate and increase the number of TREG in non-human primates and to monitor for unexpected adverse events, such as cytokine release syndrome. Currently, a phase 2 clinical trial with low-dose IL-2 is ongoing in SLE patients. The IL-2-mediated changes in the immune system and disease activity observed in the SLE patients will serve to guide decisions on the suitability of these patients for IL-2 complex therapy. In addition to SLE, the principle of IL-2 complex-based TREG cell expansion could be extended to diseases currently treated with immunosuppressive drugs, such as other above-mentioned autoimmune and chronic inflammatory disorders, as well as allotransplant-associated immune-pathologies.

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Medical. Autoimmune, autoinflammatory and transplantation-related pathologies comprise a diverse set of chronic diseases commonly featuring a dysregulation of the immune system with either overt activation of effector cells or reduced activity of regulatory cells. Such often chronic and non-curable diseases have an estimated prevalence of about 3-9% of the population. Treatment is generally based on broad immunosuppression affecting nonspecifically all immune cells, thereby causing significant long-term side effects, including increased susceptibility to severe infections and malignancies. Moreover, treatment efficacies of current immunosuppressive drugs are often insufficient, demonstrating the need for novel therapies. An increasing number of immunomodulatory mAb are either approved or in early-to-late clinical trials for the treatment of chronic inflammatory conditions, autoimmune diseases and organ transplant rejection (17). Their application has led to great improvements in the treatment of MS, RA, SLE, AS, psoriasis psoriatic arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis (17). However, each therapy has its limitations and is effective against only certain diseases, while being ineffective or even harmful in other cases (17). This spectrum is mostly caused by the fact that most immunomodulatory mAb target specific molecules that are only implicated in certain diseases and not in others. There is a high unmet medical need to develop mAb therapies that are effective against a broader range of inflammatory diseases and could be used either as stand-alone or in support of current mAb therapies to improve efficacy and address problems of anti-idiotypic antibody formation that would lead to loss of efficacy. Societal. The number of people with MS, RA, SLE, Crohn's disease and ulcerative colitis totals to around 300,000 in the Netherlands alone. Therefore, the societal impact of a broadly applicable therapy against these diseases is enormous. Furthermore, TREG therapy can potentially be used to prevent type I diabetes mellitus, when applied in the early inflammatory stages of disease. Since, type I diabetes has life-long consequences and concerns about 100,000 people (in The Netherlands), the economic and societal implications of prevention are considerable. Scientific. While the underlying principle of using IL-2 targeting mAb to amplify number and function of TREG have already been established in mouse models (14), the new results obtained in non-human primates, with mAb generated for use in humans, will be published.

Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	De DEC zegt hierover: De kennis en kunde van de onderzoeksgroep is evident gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's. Immunologie is een speerpunt van de onderzoekinstelling. 11.1

3V's

Vervanging	
	3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates: Citaat: As part of the non-clinical evaluation, cytokine and mAb therapies are first tested in in vitro immunopharmacology studies to measure relative cell/antigen specificity of the compound by flow cytometry and cell based assays or competitive immune-assays. In addition, binding to human and animal target tissues will be determined using immunohistochemical techniques. However, further in vivo studies are usually needed because the in vitro culture procedure, the limited time span of culture of primary immune cells as well as an underrepresentation of the complex multicomponent tissue dependent interactions taking place in the organism make full extrapolation to the human situation rather unprecise. Although rodent models are very valuable for proof of principle studies and to investigate the mechanism of action of new therapeutic agents, they are not suitable to evaluate the efficacy and possible adverse effects of therapeutic agents that are specifically tailored to bind human target molecules or involve human mAb. The only suitable animal model to investigate these aspects are non-human primates that express target molecules that are sufficiently homologous to be recognized and that have the appropriate immunoregulatory molecules and physiology to allow adequate assessment of efficacy and adverse events. Studies to evaluate mAb based immunotherapies are usually performed in macaque species because of their close phylogenetic relationship to humans, their well characterized immune-system and the availability of the required immunological tools.

Verminderen	
	3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates: Citaat: Only the minimum number of animals needed will be used. Based on preceding experiments in rodents and evaluation of other cytokine and mAb immunomodulatory therapies in macaques, the maximum number of animals per group needed to effectively determine PK/PD characteristics and monitor for inadvertent general immune activation is three animals. Furthermore, we aim to evaluate different doses at the same time and to include more than one candidate therapeutic, so that a single control group can be used. The control group is needed to correct for effects induced by the vehicle or by the sedation alone.

Verfijnen	
	3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates: Citaten:Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via gavage) when animals need to be daily sedated for blood sampling. The gavage is given during the sedation for a maximum period of five days. This reduces the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving sedation. The number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum. All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, a standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of vascular leakage syndrome (e.g. dehydration, nausea, breathing pattern, temperature increase). Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for enrichment in our institute. All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database thus facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relief the pain, if necessary. Appropriate measures will be taken in case clinical symptoms indicative of vascular leakage syndrome are observed in order to minimize discomfort. In case a daily blood draw is required then the animals will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited. Regular analysis of haematological and clinical chemistry parameters is part of the experiment. If necessary, judged by the veterinarian, measures will then be taken to treat the animal.
3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates: 11.1	
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.

3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates: Citaat: Animals to be used in these experiments may have been used in other studies, provided that they did not previously receive immunosuppressive therapy or mAb administration. Given the long lifespan of this species reuse will take place in the legal framework described in art. 1 of the law on animal testing.

Naam proef	**Worden de dieren gedood?**	**Doden volgens richtlijn?**
3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates	HEP: <5%	Citaat: Animals are monitored twice daily and a clinical scoring list is used to assess if an animal shows clinical symptoms suggestive of progress to a vascular leakage syndrome. In combination with the clinical chemistry and hematology data this information will be used to assess in consultancy with the veterinarian the likelyhood of immediate progress to vascular leakage syndrome. In that case the animal will be euthanized immediately in order to avoid unnecesary suffering and a full necropsy will be performed.
Andere soorten niet-menselijke primaten (andere soorten Ceboidea en Cercopithecoidea)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting
Deze aanvraag bevat voldoende informatie over de doelstelling, het belang, de 3V's en humane eindpunten om tot een besluit te komen.

11.1

Dieren worden gedood als ze een humaan eindpunt bereiken, of als pathologische analyse deel van de proef is. In andere gevallen, zullen de dieren teruggaan naar de "voorraad" en eventueel voor hergebruik in aanmerking komen. Ook kunnen deze dieren al gebruikt zijn in andere studies voordat ze in onderliggende project worden ingezet. Hergebruik zal

plaatsvinden zoals in de wet is toegestaan.

Voorafgaand aan de verschillende bloedafnames worden de dieren gevast, omdat de dieren gesedeerd worden. De duur van deze vasten-perioden wordt niet benoemd. De aanvrager is nog gevraagd dit aan te vullen.

De aanvrager geeft aan beide geslachten te kunnen gebruiken, maar per studie slechts 1 geslacht in te zetten, vanwege de bekende verschillen in prevalentie van auto-immuunziekten en de verschillen in het percentage van regulatoire T cellen tussen mannen en vrouwen. Het eerste argument kan een rol spelen bij de vervolgstudies die nog niet in dit project beschreven zijn, en mogelijk niet door de aanvrager zelf zullen worden uitgevoerd.

Voorwaarden

Beoordeling achteraf
In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

Centrale Commissie Dierproeven **12**

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Biomedical Primate Research Centre
10.2.e
Postbus 3306
2288 GJ RIJSWIJK

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD5020020197924
Bijlagen
1

Datum 8 juli 2019
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e ,

Op 3 mei 2019 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immunotherapeutics aimed to induce regulatory T-cells" met aanvraagnummer AVD5020020197924. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 8 juli 2019 tot en met 30 april 2022.
De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie
Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie (DEC) 10.2.g . Dit advies is ontvangen op 28 mei 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Nadere vragen aanvrager
Op 1 juli 2019 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op beschrijving van de herkomst van de dieren, beschrijving van de (duur van de) vastenperiode van de dieren en het meewegen van het vasten van de dieren in de ongeriefsclassificatie. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen
Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf
Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d en artikel 10a1 lid 3 van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project niet-humane primaten gebruikt worden. Vanwege het gebruik van niet humane primaten is een beoordeling achteraf vereist. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2023 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:
8 juli 2019
Aanvraagnummer:
AVD5020020197924

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2.g

Algemeen Secretaris

Bijlagen:
- Vergunning
  Hiervan deel uitmakend:
  - DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	Biomedical Primate Research Centre
Adres:	Postbus 3306
Postcode en plaats:	2288 GJ RIJSWIJK
Deelnemersnummer:	50200

deze projectvergunning voor het tijdvak 8 juli 2019 tot en met 30 april 2022, voor het project "Pre-clinical PK/PD evaluation in non-human primates of immunotherapeutics aimed to induce regulatory T-cells" met aanvraagnummer AVD5020020197924, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.g .
Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 3 mei 2019
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
   a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 28 mei 2019;
   b Bijlagen dierproeven
      - 3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates, zoals ontvangen op 28 mei 2019;
   c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 28 mei 2019;
   d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 28 mei 2019
   e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 1 juli 2019.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 DRF and PK/PD analysis of Treg inducing therapeutic agents in non-human primates			
	Andere soorten niet-menselijke primaten (andere soorten Ceboidea en Cercopithecoidea) / Macaca mulatta of Macaca fascicularis	30	100,0% Matig

Voorwaarden

Beoordeling achteraf
In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Aanvraagnummer:
AVD5020020197924

Ter informatie
Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Aanvraagnummer:
AVD5020020197924

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen
Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging
De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.
In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving
In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef
Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.
Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.
Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.
In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

Levensloopdossier
Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primaat moet volgens artikel 15a van de wet een levensloopdossier bijgehouden worden.

Niet-menselijke primaten
De Minister heeft een ontheffing verleend volgens artikel 10e lid 7, die het gebruike van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

Beoordeling achteraf
Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige

mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.