



## Bijlage Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of neem telefonisch contact op (0900-2800028).

### 1

#### Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50200	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Biomedical Primate Research Centre	
1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.	Volgnummer	Titel dierproef
	2	Therapie evaluatie in het marmoset EAE model.

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Dit voorstel omvat het gebruik van een gevalideerd diermodel voor de neurologische ziekte multiple sclerose (MS), namelijk experimenteel geïnduceerde auto-immuun encefalomyelitis (EAE) in de common marmoset (*Callithrix jacchus*, het penseelaapje), ten behoeve van translationeel en toegepast onderzoek voor de ontwikkeling van therapieën. Voor de EAE studies zullen wij uitgaan van de experimentele opzet zoals die is gebruikt in eerdere succesvol verlopen EAE studies (onder AVD502002017881). Voor het fundamentele onderzoek zullen de dieren worden geïmmuniseerd met rhMOG/IFA. Voor het translationele en toegepaste onderzoek zal er tenminste 1 groep dieren het kandidaat-geneesmiddel krijgen, met daar tegenover een controlegroep die een relevant controlepreparaat krijgt toegediend, afhankelijk van de toedieningsroute (i.v., i.p., s.c., of oraal). De twee behandelingsopties zijn: 1. Preventief: hierbij begint de behandeling voor de ziekte-inductie of 2. Therapeutisch: hierbij begint de behandeling na de ziekte-inductie.

De primaire uitkomstparameter is de tijd tot het ontwikkelen van de eerst zichtbare symptomen van een verstoorde motorfunctie, namelijk ataxie (ongecoördineerd bewegen) of blindheid (EAE-score 2.0, zie tabel in E) en de tijd *tot* het humane eindpunt, verlamming van het onderlijf (EAE score 3.0; zie E). Hiermee kan het doel 'het bepalen van de effectiviteit van een nieuw medicijn' worden behaald. De ervaring leert dat EAE scores  $\leq 2.0$  reversibel zijn. Pas vanaf score 2.5 treedt geen spontaan herstel meer op; de ziekte is dan in de chronisch/progressieve fase. Om deze reden wordt score 2.5 als eindpunt gehanteerd, bij een score van 2.5, wordt er zo spoedig mogelijk, maar uiterlijk binnen 3 dagen euthanasie gepland om het ongerief van de verlammingssymptomen zo veel mogelijk te voorkomen.

Daarnaast kan inflammatie in de hersenen en de werking van de therapie tijdens het experiment eventueel gevolgd worden door het gebruik van magnetische resonantie imaging (MRI) en positron emissie tomografie

(PET)/ computed tomografie (CT). Verder wordt *post mortem* gekeken naar de ernst van de pathologie in de hersenen en het ruggenmerg. Door histologische analyse wordt de mate en ernst van ontsteking en weefselschade vastgesteld. Ook kan dit worden bepaald door *post mortem* MRI van het gefixeerde brein. Daarmee kan het totale oppervlak en de ruimtelijke verdeling van de laesies worden bepaald.

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

- Voor immunisatie zal er bloed worden afgenomen voor de bepaling van individuele nulwaarden van relevante parameters. Na immunisatie zal regelmatig bloed worden afgenomen voor het bepalen van relevante immuunparameters. Kleine bloedafnames (< 200 µl) worden bij ongesedeerde dieren afgenomen en grote bloedafnames (>0.5 ml) worden uitgevoerd onder sedatie (max 1 keer per week). Bij alle bloedafnames wordt rekening gehouden met een maximale afname van 0.7% van het lichaamsgewicht per afname, rekening houdend met een maximale afname van 1% van het lichaamsgewicht per maand.
- De dieren worden geïmmuniseerd door intracutane injecties in de rug (4x 100ul) met een emulsie die bestaat uit recombinant humaan myeline oligodendrocyte glycoproteïne (MOG) met incompleet Freund's adjuvant (rhMOG/IFA). Deze handeling wordt elke 28 dagen herhaald totdat een dier EAE-score 2.0 heeft ontwikkeld, met een maximum van 5 immunisaties per dier. De immunisatie gebeurt onder sedatie.
- Voor bloedafname of toediening van de teststof of het controlepreparaat en gelijktijdig meten van het lichaamsgewicht worden de dieren uitgevangen en gesedeerd. Zij worden voor aanvang van het experiment voor de vang-methode getraind. Daarnaast worden ze regelmatig ongesedeerd gewogen in de thuishooi (vrijwillig na training).
- De klinische score behorend bij EAE wordt dagelijks gemonitord (minimaal 1 keer per dag bij score 0 - 2.0 en twee keer per dag bij score > 2.0). Daarbij wordt een standaard score systeem gehanteerd waarmee de gradatie van neurologische defecten wordt vastgelegd (zie EAE-score tabel in E).
- In sommige experimenten zal het van belang zijn om tussentijds medische beeldvorming zoals een MRI of PET-CT toe te passen om in beeld te brengen hoe de pathologie in de hersenen verloopt en of de behandeling (al) effect heeft. Hierbij zal er voorafgaand aan de EAE-inductie een MRI worden afgenomen voor het in beeld brengen van de hersenstructuren en mogelijk aan het eind van het experiment postmortem voor het in beeld brengen van de ontstane laesies. De MRI zal indien mogelijk afgenomen worden op het terrein. PET-CTs zullen maximaal 1x per week worden uitgevoerd vanaf 3 weken na immunisatie om indien gewenst pathologie/neuroinflammatie te volgen, of na het ontwikkelen van EAE symptomen. Deze PET-CT vindt plaats onder sedatie (maximaal 1 injectie) en duurt maximaal 1 uur. De frequentie van de PET-CT zal altijd gaan in overleg met de veterinaire op basis van de gezondheidstoestand van de dieren. Waar mogelijk wordt het gecombineerd met andere handelingen om het ongerief zo minimaal mogelijk te houden. Op deze manier wordt ook de kwaliteit en de werking van de therapeutische teststof gedurende het EAE-traject gewaarborgd en gemonitord, naast alleen het verzamelen van data op het (humane) eindpunt.

De toedieningsroute van de teststof of controlepreparaat wordt voor iedere studie bepaald en is afhankelijk van de aard van de teststof. Afhankelijk van de toedieningsroute zal de teststof of controlepreparaat eenmalig of herhaaldelijk worden gegeven (met een maximum 1 keer per week, gedurende het experiment). De start van de toediening is afhankelijk van de teststof en de vraagstelling, soms is dit bijvoorbeeld 1 dag of 1 week voor de immunisatie, soms is dit enkele weken na de immunisatie, of een bepaalde tijd na het ontwikkelen van EAE-symptomen. Wanneer mogelijk zal de toediening zonder sedatie worden uitgevoerd om het dier het ongerief van sedatie te besparen.

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

Voor experimenten waarin het effect van een nieuwe therapie ten opzichte van een controlepreparaat wordt getest is statistische toetsing vereist. Het voor een experiment benodigde aantal dieren zal worden bepaald door middel van power-analyse. Variabelen zijn de verwachte ziekte-incidentie (op basis van de vorige vergunning AVD50200201788 met het EAZA-dieet 75%) en het verwachte effect van de behandeling.

De primaire uitkomstmaten van de studie zijn het ontwikkelen van klinische EAE-symptomen en de tijd tot het ontwikkelen van klinische EAE-symptomen (uitgedrukt in Kaplan-Meier overlevingscurves). De verschillen

in (de tijd tot) het ontwikkelen van klinische EAE-symptomen wordt getest met een non-parametrische log-rank test. Hierbij wordt een  $\alpha$ -waarde van 0.05 aangehouden als significant.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
2	Common marmoset	Eigen fok	Volwassenen	84	M/V		

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	<p>Common marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>)</p> <p>Het marmoset EAE model heeft een unieke positie in het translationeel en fundamentele MS onderzoek van ziektemechanismes en behandeling. Vanwege de grote immunologische, klinische en pathologische overeenkomsten met MS is het model een essentiële overbrugging van de brede kloof tussen de knaagdier EAE modellen en de humane patiënt. Bepalend voor de preklinische relevantie zijn:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. De huidige sterk verfijnde marmoset EAE-modellen zijn gebaseerd op de reactivatie van effector-geheugen T cellen in het immuunrepertoire van de non-humane primate. Daarnaast is de aanwezigheid van virussen in het immuunrepertoire van de marmoset sterk overeenkomstig met die van de mens.</li> <li>2. De modellen kunnen worden gebruikt voor onderzoek naar de pathogenese en behandeling van progressieve MS; een laat optredende vorm van de ziekte waarvoor nog geen behandeling bestaat. Het EAE-model in de marmoset is het enige huidige model waarin relevante pathologie van progressieve MS is aangetoond.</li> <li>3. Experimenten gericht op de effectiviteit van nieuwe therapeutische principes in het marmoset EAE-model vinden vaak plaats in de laatste fase van het preklinische ontwikkelingstraject. Het therapeutisch middel kan een monoclonaal antistof, een cytokine, oplosbare receptor of een ge-engineerde cel zijn, die ontwikkeld is voor werkzaamheid in de mens. In de meeste gevallen zijn deze middelen alleen werkzaam in nauw aan de mens verwante diersystemen, zoals non-humane primaten waaronder de marmoset.</li> <li>4. Wanneer mogelijk zullen de experimenten worden opgezet in beenmerg-chimere tweelingen, welke immunologisch verwant zijn. Historische data laten zien dat de immuunrespons binnen een tweeling meer overeenkomt dan tussen niet-tweelingen. Hierdoor kunnen we beter de effecten van de therapie bepalen.</li> </ol> <p>Daarnaast is het in de marmoset mogelijk om de werking van een therapie longitudinaal te volgen in bloed en via beeldvorming (MRI, PET-CT) en in alle lymfoïde organen aan het eind van de studie.</p>
Herkomst	Eigen fok van het BPRC, hierdoor weten we precies wat er in het verleden met een dier gebeurd is en houden we in de hand dat de dieren outbred zijn.
Levensstadia	Volwassen leeftijd.
Aantal	<p>Translationeel en toegepast onderzoek: 84 marmosets. Dit aantal is berekend uit twee onderdelen.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Het geschatte aantal studies tijdens de duur van het project (30 maanden): 3 studies.</li> <li>2. Het aantal berekende dieren per studie, zie uitleg hieronder.</li> </ol> <p><u>De statistische poweranalyse:</u></p> <p>Iedere studie zal worden uitgevoerd met een aantal van 8-14 marmosets per groep (8-14 controledieren en 8-14 dieren per experimentele groep). Het precieze aantal dieren wordt berekend door een statistische poweranalyse en de uitkomst van deze statistische poweranalyse is afhankelijk van een aantal factoren:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>I. De effectiviteit van de therapie.</li> <li>II. Het relatieve risico om EAE te ontwikkelen</li> </ol>

	<p>III. De tijd tot het ontwikkelen van EAE</p> <p>IV. De incidentie van het ontwikkelen van EAE-symptomen</p> <p>Al deze criteria worden meegenomen in een statistische poweranalyse.</p> <p>In EAE-onderzoeken is de primaire uitkomstmaat de ontwikkeling van klinische (EAE) ziekte. Hiertoe wordt een behandelde groep vergeleken met een controle (placebo)groep voor het optreden van klinische ziekte. De statistische evaluatie van de primaire uitkomstmaat kan met twee verschillende parameters worden geanalyseerd, afhankelijk van of ziektepreventie (het ontwikkelen van klinische EAE-symptomen, methode 1) of langzamere ontwikkeling van klinische ziekte (de tijd tot het ontwikkelen van klinische EAE-symptomen, methode 2) als primaire uitkomstmaat wordt gekozen. De primaire uitkomstmaten van de studie zijn het ontwikkelen van klinische EAE-symptomen en de tijd tot het ontwikkelen van klinische EAE-symptomen (uitgedrukt in Kaplan-Meier overlevingscurves). De verschillen in (de tijd tot) het ontwikkelen van klinische EAE-symptomen wordt getest met een non-parametrische log-rank test. Hierbij wordt een <math>\alpha</math>-waarde van 0.05 aangehouden als significant. Alle dieraantallen worden bepaald in overleg met een biostatisticus door middel van deze poweranalyse en op basis van voorgaande onderzoeken.</p>
Geslacht	M/V, zowel mannen als vrouwen krijgen multiple sclerose en in het verleden is gebleken dat het geslacht niet uitmaakt voor ziekte verloop.
Genetisch gewijzigd Stam	

### C. Huisvesting en verzorging

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

Ja

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

### D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee >

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

In de MS patiënt wordt soms pijnlijke spasticiteit waargenomen. Dit is tot nu toe niet gezien in EAE studies, maar kan niet voor de volle 100% worden uitgesloten. Wanneer symptomen van pijn worden geobserveerd zal orale of parenterale pijnstilling worden toegediend in overleg met de dierenarts. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de pijnstiller Buprenorfine.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. ongerief door toediening van injectie
2. ongerief door sedatie en ontwaken uit sedatie
3. ongerief door klinische symptomen EAE
4. ongerief door transport in het geval van MRI op een andere locatie
5. ongerief door solo huisvesting indien een kooigenoot weg valt

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. De inspuiting van een kleine hoeveelheid inoculum voor immunisatie kan ontsteking en irritatie geven. De inspuiting van teststof kan, afhankelijk van de plaats van de injectie, lokale pijn en irritatie veroorzaken. In het geval van PET is er een injectie van een radioactieve stof nodig, deze kan afhankelijk van de plaats lokale pijn en irritatie geven.
2. Voor sedatie moet het dier nuchter blijven. Ook het ontwaken uit anesthesie kan vervelend zijn alsmede de temperatuurverlaging tijdens sedatie.
3. EAE leidt tot symptomen als ataxie, blindheid, paresis en paralyse. Het verlies van neurologische functies kan als stressvol worden ervaren.
4. In het geval van MRI op een andere locatie (indien MRI op het terrein niet mogelijk is m.b.v. een mobiele MRI) is transport van de dieren nodig naar een andere locatie.
5. Kooigenoten kunnen eventueel wegvallen indien deze eerder EAE-symptomen ontwikkelen en een humaan eindpunt bereiken waarop zij worden gedood. Hierdoor is de achterblijvende kooigenoot alleen gehuisvest.

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

1. Alle dieren worden intensief getraind om te wennen aan de experimentele procedures. Ongerief van inspuitingsplaatsen zal naar verwachting licht zijn. Wanneer nodig zal in overleg met de dierenarts medicatie worden toegediend.
2. Dieren liggen op een warmtemat ter voorkoming van temperatuurverlaging tijdens sedatie.
3. Wanneer neurologische defecten worden waargenomen zal de hoogte van de kooi worden verminderd. Dit om te voorkomen dat de dieren vallen. We werken met een cumulatieve discomfort schaal (zie ook E). Dieren worden geëuthanaseerd wanneer het humane eindpunt is bereikt.
4. Tijdens het transport wordt er verrijking vanuit de eigen kooi meegenomen om de dieren een bekende geur mee te geven wat ze enigszins gerust kan stellen. Met het transport gaat er ook een dierenarts of ervaren biotechnicus mee.
5. Als door overlijden een dier alleen in een kooi achterblijft zal deze gedurende de studie alleen gehuisvest blijven tot het einde van de studie of tot het bereiken van een humaan eindpunt. Herintroductie van een nieuwe kooigenoot tijdens de studie kan voor meer stress en ongerief zorgen dan het tijdelijk alleen gehuisvest worden.

## E. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dieren worden gedood wanneer het eindpunt volgens tabel 1 is bereikt, of maximaal 150 dagen na de eerste immunisatie, of wanneer het algemeen welzijn door andere omstandigheden ernstig wordt aangetast. De maximale tijdsduur in tabel 1 is cumulatief. De humane eindpunten voorkomen dat matig ongerief ernstig wordt en daarom is er geen ernstig ongerief in deze dierproef. Door het hanteren van de eindpunten in Tabel 1 worden de dieren uit studie genomen in een fase waarin de dieren nog steeds zelfredzaam zijn en waarin zelfstandig eten en drinken en het aangaan van sociale interacties in voldoende mate mogelijk blijven. Bij een score van 2.5 zal het dier zo snel mogelijk uit de studie worden genomen, met in achtneming van het plannen van de necropsie, met een maximale tijdsduur zoals in onderstaande tabel. Indien score 4 voor komt is onmiddellijke actie vereist, zonder in achtneming van geplande necropsie.

**Tabel 1: Cumulatieve EAE scoringstabel**

EAE score	Klinische symptomen	Maximale cumulatieve Tijdsduur tot humane eindpunt
0	Asymptomatisch	Eind experiment
0.5	Verminderd alert, veranderd loopgedrag zonder ataxie	20 weken

<b>1</b>	Apathisch (verminderde reactie op externe prikkel, tremor, slechthoort)	10 weken
<b>2</b>	Ataxie (= evenwichtsstoornis), blind	4 weken
<b>2.25</b>	Parese (incomplete verlamming) van 1 ledemaat	7 dagen
<b>2.5</b>	Parese (incomplete verlamming) van 2 ledematen	3 dagen
<b>3.0</b>	Parese (incomplete verlamming) van 3-4 ledematen, of Paralyse (complete verlamming) van 1 (hemiplegie) of meerdere ledematen (paraplegie)	z.s.m. tot maximaal 18 uur
<b>4.0*</b>	Complete verlamming van 4 ledematen (quadriplegie)	1 uur*

\* Dit stadium is nog nooit voorgekomen sinds de invoering van IFA als adjuvant.

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

Na immunisatie met rhMOG/IFA loopt 75% van de dieren kans EAE te ontwikkelen. De kans op het behalen van het humane eindpunt in de studie is in de controlegroep gemiddeld 75% op basis van het vorige onderzoek met rhMOG/IFA op het EAZA-dieet (AVD502002017881). Bij deze studie haalde 0% een score van 3.0, maar wel 2/8 dieren 2,75. We schatten daarom in dat 25% van de dieren mogelijk een score van 3.0 zou kunnen behalen. De incidentie in de groep die behandeld wordt met de te testen therapie kan lager liggen als gevolg van de behandeling.

## F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

Het cumulatieve ongerief wordt geclassificeerd als matig. Het ongerief wordt bepaald door herhaalde bloedafnames, herhaalde injecties en het ontwikkelen van EAE symptomen.

Indien er geen EAE-symptomen optreden, bijvoorbeeld als gevolg van een geslaagde behandeling met de teststof of het niet ontwikkelen van EAE, is het ongerief nog steeds matig als gevolg van de herhaalde bloedafnames en injecties, welke laesies op de huid kunnen veroorzaken. Deze laesies in de huid ontwikkelen zich als gevolg van de injecties en kunnen jeuk en irritatie veroorzaken. Deze laesies kunnen nog wel enkele weken tot maanden zichtbaar blijven, maar zullen wel in ernst afnemen. Het ongerief loopt dus met elke immunisatie licht op door meerdere laesies, maar het ongerief zal hierdoor nooit meer dan matig worden.

## G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	<p>Multipale sclerose is een ziekte veroorzaakt door complexe interacties tussen het centrale zenuwstelsel en het gehele immuunsysteem. Met de huidige stand van de techniek is het niet mogelijk deze interactie buiten het levende dier te bestuderen. Wel worden biologicals vaak eerst <i>in vitro</i> getest op hun capaciteit om aan het beoogde target in de marmoset te binden.</p> <p>Binnen het neuroimmunologisch onderzoeksveld worden met name muizen en ratten gebruikt die vrij zijn van specifieke ziektekiemen (SPF). De huidige sterk verfijnde marmoset modellen, waarbij CFA is vervangen door IFA, zijn gebaseerd op een wezenlijk ander pathogeen mechanisme dan de gebruikte EAE modellen in muis en rat [4]. In de marmoset is EAE het gevolg van de reactivatie van effector-geheugen T cellen die aanwezig zijn in het mature immuun-repertoire van de primate, dat is gevormd door de interactie van genetische factoren met omgevingsfactoren. Daarnaast worden de</p>
------------	--

	<p>marmoset EAE modellen ook gebruikt voor onderzoek naar de pathogenese en behandeling van progressieve MS; een laat optredende vorm van de ziekte waarvoor nog geen behandeling bestaat. Het EAE model in de marmoset is het enige huidige model waarin relevante pathologie van progressieve MS is aangetoond zoals de ontwikkeling van grijze stof laesies in de hersenen. Bij EAE in knaagdiermodellen vindt de pathologie voornamelijk plaats in het ruggenmerg en niet in de hersenen terwijl dit niet het geval is bij mensen met MS. Bovendien vinden experimenten gericht op de effectiviteit van nieuwe therapeutische principes in het marmoset EAE model vaak plaats in de laatste fase van het preklinische ontwikkelingstraject. Het therapeutisch middel kan een monoclonaal antistof, een cytokine, oplosbare receptor of een bewerkte cel zijn, die ontwikkeld is voor werkzaamheid in de mens. In de meeste gevallen zijn deze middelen alleen effectief in nauw aan de mens verwante diermodellen, zoals non-humane primaten waaronder de marmoset.</p> <p>4. t Hart, B.A., <i>Experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset: a translationally relevant model for the cause and course of multiple sclerosis</i>. Primate Biol, 2019. <b>6</b>(1): p. 17-58.</p>
Vermindering	<p>Het effect van een nieuw therapeutisch principe in het model dient in de regel statistisch te worden aangetoond. Het benodigd aantal dieren per groep om de resultaten statistisch te kunnen toetsen zal worden bepaald door middel van een power-analyse. Het minimaal aantal benodigde dieren zal worden gebruikt. Kritische variabelen, zoals ziekte incidentie en spreiding in het ziekteverloop zullen worden gemodelleerd naar eerdere EAE studies. Indien mogelijk zullen meerdere therapeutische groepen een controle groep delen om het aantal dieren te verminderen. Daarnaast kunnen, door de zorgvuldige opslag van weefsels, toekomstige onderzoeksvragen voor toegepast onderzoek mogelijk beantwoord worden zonder het gebruik van nieuwe dieren.</p>
Verfijning	<p><i>Adjuvant</i>: Een belangrijke storende factor in het EAE onderzoek is de noodzaak om het bacteriële adjuvant CFA te gebruiken. Het eerste nadeel van het gebruik van CFA is dat het ernstige ulceraties veroorzaakt rond de injectieplaatsen in de huid. Een tweede nadeel is dat CFA een autoimmuun-proces activeert waarin de CD4+ T-cel een dominante rol speelt. Er is sterk toenemende twijfel aan de relevantie van dit proces voor MS, waar de auto-immuniteit wordt gedomineerd door de CD8+ T-cel. Een derde nadeel is dat CFA de inductie van een neutraliserende immuunrespons tegen Biologische teststoffen versterkt. De vervanging van CFA door IFA ondervangt al deze nadelen.</p> <p><i>Experimentele verfijning</i>:</p> <p>1) Voor longitudinale monitoring van de immunologische reactie wordt tijdens een gemiddeld experiment per keer 1 ml bloed afgenomen. Er is veel geïnvesteerd in micro-methodes om zoveel mogelijk informatie te krijgen uit dit beperkte bloedvolume.</p> <p>2) Wanneer mogelijk zullen de experimenten worden opgezet in beenmerg-chimere tweelingen, welke immunologisch verwant zijn. Historische data laten zien dat de immuunrespons binnen een tweeling meer overeenkomt dan tussen niet-tweelingen. Hierdoor kunnen we meer data halen uit het marmoset EAE-model doordat het immuunsysteem van het controledier en het experimentele dier hetzelfde zijn.</p>
Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?	
<input checked="" type="checkbox"/> Nee	
<input type="checkbox"/> Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.	

## H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee, ga verder met vraag I.

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

Er is in principe geen bezwaar tegen hergebruik van marmosets, mits geselecteerde dieren niet zijn behandeld met een product dat kan interfereren met het EAE model of het kandidaat-geneesmiddel dat zal worden getest. Aangezien marmosets na een EAE studie altijd worden opgeofferd voor neuropathologisch en neuroimmunologisch onderzoek is hergebruik van EAE dieren uitgesloten.

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

Nee

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

### I. Herhaling

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

Niet van toepassing

### J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

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

### K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

De dieren worden altijd gedood aan het einde van het experiment. Ten einde onderzoek te kunnen doen naar de pathologie in het centrale zenuwstelsel en de immuunrespons in de lymfoïde organen is het noodzakelijk de dieren te doden

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

De dieren worden eerst onder narcose gebracht met een mix van twee verschillende anesthetica: Alfaxan (relaxatie spieren) en Ketamine (pijnbestrijding). Wanneer het dier dan onder narcose is wordt het euthanasaat (Euthasol:Phenytoin/Pentobarbital) toegediend.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.



---

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

---

n.v.t.

---