



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

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

Infectieziekten zijn wereldwijd verantwoordelijk voor vele miljoenen doden per jaar. In de top 10 van doodsoorzaken wereldwijd staan infecties van de lage luchtwegen en tuberculose op plaats 4 en 10, respectievelijk, naast ziekten zoals hartaandoeningen, beroerte en Alzheimer. In derdewereldlanden staan aids, infectieuze diarree, malaria, tuberculose alsmede infecties van de lage luchtwegen hoog in de top 10 van doodsoorzaken. Ondanks de grote vooruitgang in het terugdringen van het aantal doden door infecties, staat de wereld voor grote uitdagingen om de gezondheid wereldwijd (Global Health) verder te verbeteren. Vaccinatie is de meest effectieve manier om infectieziekten te bestrijden. Echter, voor veel infectieziekten die momenteel een groot aantal slachtoffers eisen, is nog geen effectief vaccin beschikbaar. Daarom is onderzoek nodig om inzicht te krijgen in de pathogene mechanismen van de ziekteverwekkers met het doel om nieuwe vaccins te vinden. Verder is het, bij gebrek aan effectieve vaccins, noodzakelijk om ook onderzoek te doen naar nieuwe behandelmethoden, omdat veel van de huidige problemen met de bestrijding van de infectieuze ziekten deels ook worden veroorzaakt doordat de huidige behandelingen met stoffen zoals antibiotica, anti-malaria en antivirale middelen onvoldoende werken, onacceptabele bijwerkingen hebben, of doordat resistentie optreedt tegen de huidige antimicrobiële middelen.

Voor enkele infectieuze organismen is het mogelijk om onderzoek te doen in patiënten of vrijwilligers. Echter, wanneer de aard van de te testen behandeling, de mogelijkheden voor het testen van effectiviteit en/of de studies die nodig zijn om de bijbehorende wetenschappelijke vragen te beantwoorden op ethische gronden niet verantwoord zijn in de mens, is proefdieronderzoek nog nodig zolang er nog geen alternatieven voor bestaan. Proefdieronderzoek is vaak belangrijk om verschillende aspecten van gastheer-pathogene interacties en de effecten van nieuwe vaccins of behandelingen te onderzoeken, die niet onder geldende randvoorwaarden bestudeerd kunnen worden in mensen. Voor die vragen die niet beantwoord kunnen worden in "lagere" diersoorten, zoals knaagdieren of vissen, en/of waar bevestiging nodig is in een model dat de humane situatie het meest benadert, worden in specifieke gevallen niet-humane primaten (NHP) gebruikt. Onderzoek met niet-humane primaten is vaak belangrijk om de vertaalslag naar de mens te kunnen maken (1-3). Zoals beschreven in een recent EU rapport (3) zijn NHP met name belangrijk in onderzoek naar ernstige en levensbedreigende infectieziekten, hersenonderzoek en enkele chronische ziekten. Het onderzoek voor deze aanvraag betreft het onderzoek naar ernstige, levensbedreigende infectieziekten zoals malaria, tuberculose, HIV/AIDS, pandemische influenza en virusinfecties overgebracht door geleedpotigen, zogenoemde Arbo (arthropod borne) virussen zoals Dengue virus, Zika virus en West Nile virus (4-9). Het onderzoeksinstituut heeft uitgebreide ervaring met dit onderzoek en het gebruik van NHP hierin. Het onderzoek richt zich op het testen van nieuwe vaccins, therapieën of medicijnen en op onderzoek naar de mechanismen van infectie en pathogeniteit. Veel aspecten van de ziekten en de behandelingen worden onderzocht in dieren die geïnfecteerd worden met het betreffende pathogeen. In het kader van deze in vivo modellen is in een aantal gevallen in vitro onderzoek met bloed van NHP nodig, bij het opzetten van de juiste assays om een goede beoordeling van effectiviteit van de te testen behandeling mogelijk te maken hetgeen de translatie naar de mens sterk verbeterd, voorafgaande testen voor selectie van dieren voor de studies. Met deze in vitro assays wordt verfijning van de modellen bereikt, kan mogelijk reductie in aantal proefdieren worden bereikt en wordt translatie naar de mens verbeterd.

Om te waarborgen dat in vivo studies alleen worden uitgevoerd onder de meest optimale omstandigheden vinden waar mogelijk eerst *in vitro* studies met bloed of bloedproducten (bijv. cellen, plasma) plaats,

bijvoorbeeld om een nieuw middel te karakteriseren of kruisreactiviteit en/of *in vitro* veiligheid vast te stellen. Daarnaast kan dit bloed gebruikt worden om de meest geschikte dieren voor het vervolg *in vivo* onderzoek te selecteren. De resultaten uit dit *in vitro* onderzoek worden gebruikt om de *in vivo* studies zo optimaal mogelijk uit te voeren met zo min mogelijk dieren.

Het bloed wordt gebruikt voor verschillende aspecten van het *in vitro* onderzoek, waaronder:

- *In vitro* assays die dierproeven kunnen vervangen (10).
- *In vitro* assays waarvan de resultaten kunnen leiden tot verfijning van *in vivo* studie en/of vermindering van het aantal benodigde dieren.
- Inzicht in de werking van immunologische mechanismen in NHP *in vitro* (11-13).
- Vaststellen van de werkzaamheid en veiligheid van nieuwe teststoffen in NHP *in vitro* en hoe deze zich verhoudt tot de werkzaamheid (14, 15).
- Het beter begrijpen van effecten die gevonden worden in *in vivo* experimenten (16).
- Voor het onderhouden van kweken van malariaparasieten (of andere relevante pathogenen) die gebruikt worden voor fundamenteel wetenschappelijk onderzoek en onderzoek naar nieuwe vaccins en antimalariamiddelen voordat deze in relevante apenmodellen verder onderzocht worden (10, 17, 18).
- Het testen van de geschiktheid van individuele dieren voor de beoogde infectiestudie.

Het eerste doel van het gebruik van bloed van gezonde dieren is de verfijning van de dierproeven en het verminderen van de aantallen dieren die nodig zijn voor de *in vivo* testen. Een voorbeeld hierbij is het onderzoek naar malaria. In het onderzoeksinstituut zijn al *in vitro* methoden ontwikkeld voor onderzoek naar bepaalde malariasoorten en de ontwikkeling van nieuwe medicijnen hiertegen. Hierbij is het aantal dieren dat nodig is voor het onderzoek drastisch verminderd. Om dit aantal nog verder te reduceren moeten specifieke bloedkweken opgezet worden.

Om nieuwe alternatieven voor experimenten in dieren te ontwikkelen en hier verder onderzoek naar te doen is het gebruik van bloed/bloedproducten van de betreffende dieren onontbeerlijk.

#### Referenties

- [1] 't Hart BA, Bogers WM, Haanstra KG, Verreck FA, Kocken CH. The translational value of non-human primates in preclinical research on infection and immunopathology. *Eur J Pharmacol.* 2015;759:69.
- [2] Phillips KA, Bales KL, Capitanio JP, Conley A, Czoty PW, t Hart BA, et al. Why primate models matter. *Am J Primatol.* 2014;76(9):801.
- [3] SCHEER. Final Opinion on 'The need for non-human primates in biomedical research, production and testing of products and devices (update 2017)'. 2017 18 May 2018. Report No.
- [4] Dijkman K, Sombroek CC, Vervenne RAW, Hofman SO, Boot C, Remarque EJ, et al. Prevention of tuberculosis infection and disease by local BCG in repeatedly exposed rhesus macaques. *Nat Med.* 2019;25(2):255.
- [5] Pasini EM, Zeeman AM, Voorberg-van der Wel A, Kocken CHM. *Plasmodium knowlesi*: a relevant, versatile experimental malaria model. *Parasitology.* 2018;145(1):56.
- [6] Koopman G, Mooij P, Dekking L, Mortier D, Nieuwenhuis IG, van Heteren M, et al. Correlation between Virus Replication and Antibody Responses in Macaques following Infection with Pandemic Influenza A Virus. *J Virol.* 2015;90(2):1023.
- [7] Mooij P, Koopman G, Drijfhout JW, Nieuwenhuis IG, Beenhakker N, Koestler J, et al. Synthetic long peptide booster immunization in rhesus macaques primed with replication-competent NYVAC-C-KC induces a

- balanced CD4/CD8 T-cell and antibody response against the conserved regions of HIV-1. *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 6):1478.
- [8] Mooij P, Koopman G, Mortier D, van Heteren M, Oostermeijer H, Fagrouch Z, et al. Pandemic Swine-Origin H1N1 Influenza Virus Replicates to Higher Levels and Induces More Fever and Acute Inflammatory Cytokines in Cynomolgus versus Rhesus Monkeys and Can Replicate in Common Marmosets. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0126132.
- [9] Verstrepen BE, Fagrouch Z, van Heteren M, Buitendijk H, Haaksma T, Beenhakker N, et al. Experimental infection of rhesus macaques and common marmosets with a European strain of West Nile virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(4):e2797.
- [10] Kocken CH, Ozwara H, van der Wel A, Beetsma AL, Mwenda JM, Thomas AW. Plasmodium knowlesi provides a rapid in vitro and in vivo transfection system that enables double-crossover gene knockout studies. *Infect Immun*. 2002;70(2):655.
- [11] Koopman G, Beenhakker N, Burm S, Bouwhuis O, Bajramovic J, Sommandas V, et al. Whole blood stimulation with Toll-like receptor (TLR)-7/8 and TLR-9 agonists induces interleukin-12p40 expression in plasmacytoid dendritic cells in rhesus macaques but not in humans. *Clin Exp Immunol*. 2013;174(1):161.
- [12] Lugo-Villarino G, Troegeler A, Balboa L, Lastrucci C, Duval C, Mercier I, et al. The C-Type Lectin Receptor DC-SIGN Has an Anti-Inflammatory Role in Human M(IL-4) Macrophages in Response to Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol*. 2018;9:1123.
- [13] Haanstra KG, van der Maas MJ, Hart BA, Jonker M. Characterization of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in rhesus monkeys. *Transplantation*. 2008;85(8):1185.
- [14] Haanstra KG, Dijkman K, Bashir N, Bauer J, Mary C, Poirier N, et al. Selective blockade of CD28-mediated T cell costimulation protects rhesus monkeys against acute fatal experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2015;194(4):1454.
- [15] Vierboom MP, Ossevoort M, Sick EA, Haanstra K, Jonker M. Induction of allograft tolerance through costimulatory blockade: first selection of drugs in vitro. *Transpl Immunol*. 2003;11(2):215.
- [16] Bertschi NL, Voorberg-van der Wel A, Zeeman AM, Schuierer S, Nigsch F, Carbone W, et al. Transcriptomic analysis reveals reduced transcriptional activity in the malaria parasite Plasmodium cynomolgi during progression into dormancy. *Elife*. 2018;7.
- [17] Demebele L, Franetich JF, Lorthiois A, Gego A, Zeeman AM, Kocken CH, et al. Persistence and activation of malaria hypnozoites in long-term primary hepatocyte cultures. *Nat Med*. 2014;20(3):307.
- [18] Zeeman AM, van Amsterdam SM, McNamara CW, Voorberg-van der Wel A, Klooster EJ, van den Berg A, et al. KAI407, a potent non-8-aminoquinoline compound that kills Plasmodium cynomolgi early dormant liver stage parasites in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(3):1586.
- [19] Graham ML, Rieke EF, Dunning M, Mutch LA, Craig AM, Zolondek EK, et al. A novel alternative placement site and technique for totally implantable vascular access ports in non-human primates. *J Med Primatol*. 2009;38(3):204.
- [20] Mutch LA, Klinker ST, Janecek JJ, Niewinski MN, Lee RMZ, Graham ML. Long-Term Management of Vascular Access Ports in Nonhuman Primates Used in Preclinical Efficacy and Tolerability Studies. *J Invest Surg*. 2018;1.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

**Het hoofddoel van dit project is het verkrijgen van bloed van gezonde apen om daarmee *in vitro* testen op te zetten, met name als vooronderzoek voor het opzetten/uitvoeren van apenmodellen ten behoeve van voorkoming of genezing van ernstige en levensbedreigende infectieziekten. De onderzoeksdoelen betreffen: 1) ondersteuning en verfijning van *in vivo* studies en vermindering van het aantal dieren dat nodig is voor deze studies; 2) Het opzetten en uitvoeren van *in vitro* studies om resultaten uit *in vivo* studies beter te begrijpen en 3)**

**specifieke parasietkweken aan te houden. Alle studies hebben betrekking op het beantwoorden van wetenschappelijk vragen met betrekking tot mechanismen en bestrijding van infectieziekten van de mens. Afhankelijk van de ziekte en de vraagstelling worden de resusaap (*Macaca mulatta*) of de Java aap (*Macaca fascicularis*) gebruikt. Waar mogelijk wordt het bloed van 1 dier voor meerdere testen gebruikt.**

Binnen het instituut bestaat uitgebreide ervaring met het werken met niet-humane primaten en grote expertise op het gebied van *in vitro* methoden. De infrastructuur en de expertise zijn aanwezig om deze studie veilig en binnen de gestelde termijn uit te voeren.

Door het afnemen van bloed voor een brede range aan infectieziekten te combineren in 1 project, creëert dit project meerwaarde, omdat op deze manier minder dieren nodig zijn dan wanneer voor elke ziekte een aparte aanvraag ingediend wordt. Er is veel geïnvesteerd in micro-methodes om zoveel mogelijk informatie te krijgen uit een zo klein mogelijk bloedvolume. Dus de af te nemen hoeveelheden zullen in de meeste gevallen klein zijn. Hierdoor kan meestal van één dier bloed voor meerdere *in vitro* studies afgenomen worden waardoor het aantal benodigde dieren lager is. Verder kunnen plasma, de rode bloedcellen en de *perifere bloed mononucleaire cellen* (PBMCs) van elkaar worden gescheiden. De rode bloedcellen kunnen gebruikt worden voor malariakweken en de PBMC's en plasma voor het onderzoeken van immunologische vraagstukken, bijvoorbeeld in het kader van tuberculose of nieuwe virale infecties.

---

### 3.3 Belang

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

In het onderzoek naar levensbedreigende en ernstige infectieziekten zijn voor specifieke vragen *in vivo* studies in NHP nodig. Om deze studies zo optimaal mogelijk uit te kunnen voeren met zo min mogelijk dieren worden zo veel mogelijk vooraf *in vitro* studies uitgevoerd. *In vitro* studies worden ook gedaan om resultaten uit *in vivo* studies beter te begrijpen en mechanismen te ontrafelen. Ook zijn deze studies soms nodig om specifieke pathogenen die nodig zijn voor het onderzoek in kweek te houden. Omdat de assays als vooronderzoek voor NHP modellen worden gebruikt of het verklaren van resultaten in deze modellen zijn hiervoor het bloed of bloedproducten van NHP nodig. Het directe wetenschappelijk belang van deze vergunningaanvraag is opzetten en/of uitvoeren van deze *in vitro* assays waarmee wetenschappelijke vragen met betrekking tot het biomedisch onderzoek kunnen worden beantwoord. Het uiteindelijke wetenschappelijk belang is het begrijpen en ontrafelen van mechanismen van voor de mens levensbedreigende infectieziekten met een zo minimaal en optimaal mogelijk gebruik van apen waarbij interventies ontwikkeld kunnen worden ter voorkoming en/of behandeling van deze ziekten. De resultaten zullen worden gepubliceerd in vooraanstaande wetenschappelijke tijdschriften. **Omdat de *in vitro* testen uitgevoerd worden in het kader van NHP studies is het bloed van NHP essentieel en kan dit niet vervangen worden door humaan bloed of bloed van andere diersoorten.**

Opzetten en/of toepassen van *in vitro* testen voor ziekten bij de mens draagt bij aan de breed gedragen maatschappelijke ideeën over verfijning en reductie van *in vivo* onderzoek bij niet-humane primaten. De verzamelde kennis zal bijdragen aan het verder ontwikkelen van deze testen. Daarnaast levert de kennis uit deze testen potentieel een bijdrage aan het bestrijden van deze ziekten.

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Binnen het onderzoeksinstituut wordt onderzoek gedaan naar verschillende infectieziekten. Afhankelijk van de ziekte en vraagstelling wordt gekozen voor een specifiek model en species. Waar mogelijk of nodig

wordt eerst voorwerk gedaan met cellijnen of bloedproducten welke al eerder zijn opgeslagen. Daarna worden de criteria bepaald waaraan de dieren moeten voldoen (bijvoorbeeld geen eerdere experimentele infectie met de veroorzaker van de te onderzoeken infectieziekte). Waar mogelijk zal het bloed worden afgenomen van dieren met een VAP. De dierenarts zal in overleg met de koloniemanager dieren selecteren die hiervoor kunnen worden gebruikt. De apen worden niet gedood en kunnen in de kolonie blijven.

Door het zo veel mogelijk gebruiken van micro-methodes zal het vaak mogelijk zijn om het afgenomen bloed van een dier voor meerdere doelen te gebruiken en tot een minimum te beperken.

Het ongerief van een bloedafname wordt voornamelijk veroorzaakt door het bijkomen uit de sedatie. Om het aantal sedaties zo veel mogelijk te verminderen zullen Vascular Access Ports (VAPs) worden geïnstalleerd bij een deel van de dieren (19, 20). Met behulp van deze VAPs kan bij getrainde dieren regelmatig bloed worden afgenomen zonder sedatie. VAPs worden ook bij kinderen en volwassenen gebruikt wanneer er frequent medicatie intraveneus moet worden toegediend of frequent bloed moet worden afgenomen. Over het algemeen treden hierbij nauwelijks complicaties op en is dit een zeer betrouwbare techniek. Deze methode is ook geoptimaliseerd voor gebruik in makaken, en de VAP kan zonder problemen gebruikt worden gedurende een periode van vele jaren (20).

Die dieren die een VAP geïmplanteerd krijgen zijn dus specifiek aangewezen voor het geven van bloed. Door het verkrijgen van bloed voor meerdere infectieziekten te combineren, kan met een kleinere groep dieren met VAPs worden volstaan dan wanneer voor elke infectieziekte apart een pool met apen beschikbaar gemaakt moet worden.

Naast de pool met dieren met VAPs, zal ook van andere dieren (zonder VAP) incidenteel bloed moeten worden verkregen. Dit is soms noodzakelijk om de verschillende aspecten van het onderzoek zoals beschreven onder 3.1 te kunnen uitvoeren met dieren die moeten voldoen aan criteria waaraan de apen met een VAP niet aan voldoen, bijvoorbeeld als de genetische, fysiologische of immunologische eigenschappen van een dier bepalend zijn voor de werking van een nieuwe teststof, zullen hiervoor de geschikte dieren moeten worden geselecteerd, ook als zij geen deel uitmaken van de pool van dieren met een VAP.

---

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

---

Eerst worden dieren geselecteerd die geschikt zijn voor de implantatie van de VAP. Na een herstelperiode kunnen de dieren bij toerbeurt geselecteerd worden voor bloedafname ten behoeve van onderzoek naar infectieziekten waarbij bloed afgenomen kan worden zonder sedatie van de hiervoor getrainde dieren. Tevens worden incidenteel dieren geselecteerd die geen VAP geïmplanteerd krijgen. Zij zullen bloed doneren middels een venapunctie onder sedatie.

---

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

---

NVT

---

---

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

---

| Volgnummer | Type dierproef                       |
|------------|--------------------------------------|
| 1          | Het verkrijgen van bloed van makaken |
| 2          |                                      |

---

|    |  |
|----|--|
| 3  |  |
| 4  |  |
| 5  |  |
| 6  |  |
| 7  |  |
| 8  |  |
| 9  |  |
| 10 |  |