



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- 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.

Auto-immuunziektes

Auto-immuunziektes vormen een scala aan, vaak chronische, aandoeningen waarbij onderdelen van het eigen lichaam het doelwit vormen van het immuunsysteem. Bekende voorbeelden van auto-immuunziektes zijn coeliakie, diabetes type I, reumatoïde artritis, myasthenia gravis, systemische lupus erythematoses en multipale sclerose (MS). Ondanks dat de afgelopen eeuw tot een sterk toegenomen medische controle over infectieziekten heeft geleid, zijn veel auto-immuunziektes nog maar beperkt behandelbaar en neemt de frequentie van dit soort aandoeningen in met name eerste wereld landen toe. Om deze ziektes beter te leren begrijpen, alsmede om therapeutica in preklinische fases te kunnen testen, zijn goede diermodellen nog steeds onontbeerlijk.

MS

MS is een zeer ernstige, veelal chronische aandoening die de zenuwbanen in het centrale zenuwstelsel (CZS) aantast. De ziekte treft vooral jong volwassenen met een incidentie van 1 op 1000. MS is daarmee na trauma de belangrijkste neurologische ziekte in jong volwassenen. Er zijn circa 17.000 MS patiënten in Nederland en de jaarlijkse kosten voor behandeling en zorg bedragen tussen de 9.000 en 45.000 EUR per patiënt, afhankelijk van de behandeling [1].

De meest voorkomende symptomen zijn ernstige vermoeidheid, tijdelijke blindheid, verminderde mobiliteit, spierzwakte, incontinentie, stijfheid, en onhandigheid en slepen van de benen (meestal asymmetrisch). Uiteindelijk kan de ziekte leiden tot gedeeltelijke of gehele verlamming van de ledematen. Naast motorische problemen ontstaan er ook problemen met geheugen en concentratie, de zogeheten cognitieve problemen [2, 3]. Patiënten met gevorderde MS hebben een sterk verminderde kwaliteit van leven, moeten al snel stoppen met werken en alhoewel MS in het algemeen niet dodelijk is, kunnen MS patiënten wel eerder overlijden als gevolg van infecties, zoals een longontsteking. In ongeveer 80% van de gevallen begint de ziekte met een relapsing-remitting (RR-MS) beloop waarbij episodes met neurologische klachten (relapses) alterneren met gedeeltelijk of zelfs geheel herstel (remissies). Rond de leeftijd van 40 jaar neemt de ziekte meestal een progressief beloop (secundair progressieve MS, SP-MS) en vindt er nauwelijks herstel meer plaats. In een minderheid van de patiënten openbaart de ziekte zich vanaf het begin als progressief (primair progressieve MS, PP-MS). Wat er precies gebeurt bij de overgang van RR naar SP-MS, of welke factoren daar een rol bij spelen is nog onbekend en is een belangrijk onderwerp van onderzoek [4].

Op dit moment zijn er 14 therapieën officieel goedgekeurd voor het behandelen van RR-MS. Dit zijn biologicals als interferon (IFN)-beta en fingolimod en antilichamen die leiden tot B-cel depletie (zoals rituxumab) of die de migratie van lymfocyten naar de hersenen blokkeren (zoals natalizumab). Deze therapieën richten zich op het remmen van de ontstekingsactiviteit van het perifere immuunsysteem, en zijn ook bewezen effectief in de diermodellen voor MS. Het ziektebeloop kan met deze aanpak sterk worden geremd, maar de patiënt kan niet worden genezen aangezien de myeline-laag en de zenuwcellen onherstelbaar beschadigd zijn. De huidige therapieën werken in een deel van de patiënten met RR-MS [7] en hebben geen of nauwelijks effect in de progressieve fase van MS. Tevens kunnen er ernstige bijwerkingen ontstaan, zoals reactivatie van virussen en autoimmun-reacties gericht tegen bijvoorbeeld de schildklier, die langdurige behandeling in de weg staan. Daarom zullen ook de komende jaren nieuwe therapieën tegen MS ontwikkeld en getest moeten worden. Voor de progressieve vormen van MS (SP-MS en PP-MS) is er pas één medicijn beschikbaar [8]. Dit komt omdat de pathogene mechanismes die tijdens progressieve MS belangrijk zijn nog onbekend zijn en een goed diermodel nog ontbreekt.

Waarom onderzoek in de niet-humane primate?

MS is een aandoening die veroorzaakt wordt door complexe interacties tussen het CZS en het gehele afweersysteem. De meeste geneesmiddelen grijpen ook in op deze interacties. Met de huidige stand van proefdiervrije alternatieven is het helaas –nog– niet mogelijk om buiten het levende dier kennis te vergaren over deze interacties of om het effect van geneesmiddelen te bestuderen. Wanneer mogelijk zullen altijd proefdiervrije alternatieven ingezet worden en zullen kandidaat-geneesmiddelen bv. eerst of alleen in knaagdieren getest worden. Er zijn echter situaties waarin niet-humane primaten (NHP) ingezet moeten worden. Het pathologisch proces dat onderzocht wordt of waarop de therapie aangrijpt, kan bv.

in knaagdieren biologisch verschillend zijn van primaten of zelfs compleet afwezig zijn. Ook is het met de huidige technologieën mogelijk om geneesmiddelen steeds specifieker voor de mens te ontwerpen, waardoor ze in knaagdieren hun aangrijpingspunt niet meer herkennen en vaak in apen nog wel.

Diermodellen en adjuvantia

Er zijn verschillende modellen voor auto-immuun geïnduceerde, neuroinflammatoire aandoeningen (zoals MS) opgezet in twee apensoorten die ingezet worden om fundamentele vragen te adresseren en om kandidaat geneesmiddelen te testen. Grofweg kan gesteld worden dat er een model is dat geschikt is om de chronische inflammatie fase tijdens MS na te bootsen in de marmoset (*Callithrix jacchus*), en een model in de resus makaak (*Macaca mulatta*) dat gepaard gaat met een zich vrij acuut ontwikkelende inflammatie van het brein, en dat daarmee meer lijkt op de acute inflammatie fase tijdens MS.

Cruciaal bij het ontwikkelen van relevante diermodellen voor menselijke auto-immuunziekten is dat de natuurlijke tolerantie van het immuunsysteem voor lichaamseigen producten doorbroken moet worden. Vaak worden om dit te bewerkstelligen hulpstoffen (*adjuvantia*) gebruikt, die het immuunsysteem stimuleren om tegen het gewenste antigeen te reageren. Wanneer in diermodellen auto-immuunziekten opgewekt worden, zijn zeer sterke adjuvantia zoals bijvoorbeeld Compleet Freund's Adjuvant (CFA) noodzakelijk om de tolerantie te doorbreken. In zowel de marmoset als in de resus makaak is het model daarom oorspronkelijk opgezet met CFA als adjuvant. Een belangrijk nadeel van CFA is dat het gebruik ervan gepaard kan gaan met de ontwikkeling van serieuze bijwerkingen, zoals onderhuidse granuloma's. Deze adjuvant-gerelateerde bijwerkingen verhogen het ongerief dat de dieren ondervinden, en zijn mogelijkterwijls te voorkomen.

In de marmoset is er de afgelopen twee decennia veel werk verricht om het model te verfijnen door middel van het gebruik van andere antigenen alsmede door te immuniseren in het mildere Incompleet Freund's Adjuvant (IFA). Dit heeft geleid tot een verfijnd model, dat helaas ook kwetsbaar is gebleken voor minimale veranderingen zoals veranderingen in het dieet [39]. De robuustheid van het model om met voldoende statistische betrouwbaarheid preklinisch onderzoek te doen is hiermee enigszins onder druk komen te staan.

In de resus makaak is het model wel robuust, maar is er nog geen alternatief voor het gebruik van CFA. Pogingen om een adjuvant-vrij model in de resus makaak te ontwikkelen zijn tot nu toe vruchteloos gebleken, en ook het gebruik van andere antigenen heeft nog niet geleid tot een terugdringing van het ongerief. De in de resus makaak optredende bijwerkingen ten gevolge van het gebruik van CFA zijn relatief ernstig in vergelijking met andere diersoorten, en er is er dus een sterke behoefte aan een mild, bijwerkingsarm adjuvant.

Binnen het instituut is de afgelopen jaren gewerkt aan adjuvant ontwikkeling met als doel om adjuvantia te maken die weinig of geen bijwerkingen geven maar die toch een sterk stimulerend effect op het immuunsysteem sorteren. Eén van deze adjuvantia, genaamd MiMyc, is ondertussen uitvoerig getest op de afwezigheid van bijwerkingen en op de aanwezigheid van immuunstimulerende effecten in de resus makaak (zie onder), en is een veelbelovende kandidaat om CFA te vervangen en daarmee het ongerief voor de dieren te verminderen. Dit projectvoorstel vormt daarmee het sluitstuk in een langlopende inspanning om CFA in het EAE model in de resus makaak te vervangen.

Het experimenteel auto-immuun encephalitis (EAE) model in meer detail

Eén van de best gekarakteriseerde diermodellen voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie is EAE. Het model is ontwikkeld in ratten, muizen en NHP [9, 10]. Het EAE model in de muis heeft in belangrijke mate bijgedragen aan de huidige inzichten in de ziekte mechanismes van MS en er zijn diverse therapieën in ontwikkeld die gebruikt worden voor de behandeling van RR-MS. Een voorbeeld daarvan is het monoclonale antilichaam natalizumab, dat de entree van immuuncellen in het CNS blokkeert. Er is echter ook een lange lijst van aanvankelijk veelbelovende kandidaat geneesmiddelen die de vertaling van de muis naar de mens niet hebben overleefd vanwege onverwachte toxiciteit of afwezigheid van werkzaamheid. Het wordt in toenemende mate duidelijk dat het EAE model in de muis zeker bruikbaar is voor fundamenteel onderzoek aan bepaalde facetten van MS, met name de rol van ontstekingscellen, maar dat het door de afwezigheid van immunologische mechanismes die werkzaam zijn in de chronische fase van MS niet optimaal bruikbaar is voor geneesmiddelontwikkeling. In bepaalde belangrijke opzichten verschilt het EAE model in de muis van MS. De laesies bevinden zich b.v. alleen in

het ruggenmerg, terwijl in MS vooral ook de hersenen zijn aangetast. Tevens lijken deze laesies qua complexiteit niet goed op de laesies in MS patiënten en lijkt oxidatieve stress afwezig te zijn [11]. Ook zijn er verschillen betreffende de immuun mechanismen die tijdens het ziektebeloop belangrijk zijn: in het EAE model in de muis spelen voornamelijk de CD4+ T-helper cellen een rol, terwijl in MS CD8+ killer T cellen zeker ook betrokken zijn.

EAE modellen in NHP lijken in immunologisch en pathologisch opzicht meer op de mens. Het EAE model in de marmoset heeft zich in de afgelopen twintig jaar ontwikkeld tot een zeer bruikbaar preklinisch model voor MS [12, 13, 14-16]. Het diersmodel deelt een aantal eigenschappen met progressieve MS, namelijk het chronische ziekteverloop en de ontwikkeling van laesies in zowel de witte als grijze stof, en kan voor beantwoording van onderzoeksvragen of geneesmiddelontwikkeling ingezet worden.

Het EAE model in de resus makaak heeft met de marmoset gemeen dat de pathologie in de hersenen plaats vindt en dat deze in bepaalde aspecten gelijkend aan is aan die in MS. Het EAE model in de resus makaak wordt gebruikt als preklinisch model voor MS, waarbij het vooral bruikbaar is om de acute inflammatie fase te modelleren. Nataluzimab, een medicijn dat goedgekeurd is voor gebruik in RR-MS en de acute inflammatie fase blokkeert, blokkeert dan ook de ontwikkeling van EAE in de resus makaak [22], en nieuwe therapieën voor MS worden ook in dit model getest [23]. In de resus makaak is het ziekteverloop echter acuter en gaat het vergezeld van ernstigere pathologie in de hersenen dan in de marmoset. Naast preklinische studies die zich richten op de acute fase van MS, wordt het diersmodel ook gebruikt om fundamentele vragen te beantwoorden die zich richten op de processen die bepalend zijn bij de overgang van acute naar chronische neuroinflammatie.

Zoals al genoemd wordt het EAE model in de resus makaak nog altijd geïnduceerd met behulp van CFA. Voor de inductie wordt het meest regelmatig gebruikt gemaakt van twee antigenen, recombinant humaan myeline oligodendrocyte glycoproteïne (rhMOG) [21], of een peptide daarvan, MOG34-56 [17, 18]. Er is in resus apen nog geen alternatief voor CFA. Immunisatie met rhMOG in IFA leidde b.v. tot EAE in slechts twee van de vijf resus makaken [19], en immunisatie met MOG34-56 in IFA van vijf resus makaken leidde helemaal niet tot klinische effecten (niet gepubliceerd). Deze incidenties zijn te laag voor gebruik in preklinische of fundamentele studies.

Voor preklinische vraagstellingen die betrekking hebben op de chronische inflammatie fase van MS, is de marmoset het model van keuze. Voor preklinische vraagstellingen die betrekking hebben op de acute inflammatie fase van MS, hangt de keuze af van meerdere factoren. Soms is de marmoset b.v. niet geschikt omdat het medicijn niet kruisreageert met het target in marmosets of als er technische beperkingen zijn (b.v. als grote bloed of cerebrospinale vloeistof volumes nodig zijn). Ook kan het zijn dat een kortdurend model gewenst is, omdat de tijd dat een medicijn zijn werk kan doen beperkt is door vorming van neutraliserende antilichamen. Voor studies van fundamentele aard, hangt de keuze van het model af van de specifieke vraagstelling en hebben beide modellen hun eigen voor- en nadelen.

Het gebruik van CFA voor EAE inductie beperkt zich niet tot Nederland, maar ook in labs in China, Japan, Frankrijk, Israël en de Verenigde Staten is dit nog steeds het standaardprotocol [40-48]. De noodzaak tot het gebruik van CFA in het resus model veroorzaakt veel ongerief bij de dieren en wordt zowel binnen als buiten het instituut als zeer ongewenst ervaren. Daarom is er binnen het instituut een *in vitro* onderzoeksprogramma opgezet om nieuwe, mildere adjuvantia te ontwikkelen die minder of geen bijwerkingen hebben maar toch effectief zijn. **Een dergelijk adjuvant is nu ontwikkeld en *in vivo* in resus makaken getest op afwezigheid van bijwerkingen en aanwezigheid van adjuvantiteit (zie hieronder).** Nog onduidelijk is of de adjuverende werking ook sterk genoeg is om tolerantie tegen lichaamseigen antigenen te doorbreken en daarmee een auto-immuunrespons te genereren die uiteindelijk resulteert in orgaan-specifieke pathologie. **Dit voorstel richt zich daarom op het uitvoeren van de proof-of-principle studies om dit mildere adjuvant te testen op functionaliteit in EAE inductie protocollen in de resus makaak.**

MiMyc in meer detail

De samenstelling van het *in-huis* ontwikkelde adjuvant MiMyc is volledig gebaseerd op *in vitro* experimenten. De stimulerende werking van adjuvantia op het adaptieve immuunsysteem verloopt voor een groot deel via activatie van receptoren van het aangeboren immuunsysteem. Om de aangeboren immunrespons die de Mycobacteria die zich in CFA bevinden normaliter induceert in kaart te brengen, hebben wij bioassays ontwikkeld. Deze hebben ons in staat gesteld om zowel in kwalitatief als kwantitatief opzicht de aangeboren immunrespons die CFA induceert na te bootsen met een mix van specifieke liganden, die wij geformuleerd hebben in IFA en die eventueel uitstekend doseerbaar is.

Vervolgens hebben we een *in vivo* experiment uitgevoerd met als doel om de bijwerkingen van MiMyc in kaart te brengen. De experimentele setup was zo gekozen dat het mogelijk was om ook de effecten van de aan- of afwezigheid van een antigeen te evalueren, evenals het effect van herhaaldelijk immuniseren. De toevoeging van antigeen aan de adjuvant preparaten, heeft ons ook in staat gesteld om geïnduceerde antigeen-specifieke (zowel B-(antilichaam) als T-cel) responsen in het bloed te meten.

Samenvattend geven de gegevens aan dat MiMyc een doseerbaar adjuvant is dat -ook in de hoogst geteste dosis, met toevoeging van antigeen en na herhaaldelijk toedienen- minimale bijwerkingen geeft (niet groter dan immunisatie in IFA). Daarnaast induceert immunisatie met antigeen in MiMyc een sterke specifieke antilichaam respons, en goed meetbare specifieke T cel responsen. Deze responsen zijn duidelijk superieur aan de responsen zoals gevonden na immunisatie met IFA, maar minder robuust dan die gevonden na immunisatie met CFA. Of deze responsen voldoende zijn om tot inductie van EAE te leiden is nog onduidelijk en onderwerp van dit voorstel.

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?

Dit project richt zich op de evaluatie van een mild adjuvant om het model voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie in de resus makaak te induceren. Het doel is om in de resus makaak CFA te vervangen door een adjuvant dat minder of geen bijwerkingen geeft, maar dat wel leidt tot auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie. Dit in het kader van Verfijning.

Nieuwe medicijnen en therapeutische interventies in de processen die een rol spelen bij zowel de acute als de chronische fasen van neuroinflammatie zijn nog steeds hard nodig en zullen de komende jaren op veiligheid en effectiviteit getest dienen te worden in relevante diermodellen, waarbij het dierenwelzijn zo min mogelijk geschaad dient te worden. In een poging dit te bewerkstelligen richten wij ons op de inzet van adjuvantia in de inductiefase van het EAE model, die notoir veel ongerief veroorzaken.

De noodzaak van vervanging van CFA in EAE inductie protocollen in makaken beperkt zich niet ons instituut want ook in labs in China, Japan, Frankrijk, Israël en de Verenigde Staten is dit nog steeds het standaardprotocol [40-48]. De afgelopen vijf jaar worden er gemiddeld eens per jaar resultaten van een grote studie met makaken aan het openbare domein toevertrouwd [45-48]. Studies die plaats hebben gevonden binnen contract research organizations of de farmaceutische industrie worden niet noodzakelijkerwijs allemaal gepubliceerd, en een conservatieve schatting is dat vervanging van CFA voor tussen de 40 en 100 makaken op jaarbasis een aanzienlijke verfijning zou betekenen.

Alhoewel niet het doel van deze studie, zou het gebruik van een milder adjuvant om de ziekte te induceren mogelijk een ander EAE ziektebeloop ten gevolge kunnen hebben. Dit zou de bruikbaarheid van het model om wetenschappelijke vragen waarin meer chronische ontstekingsprocessen onderzocht worden, ten goede kunnen komen. Mogelijkerwijs zou MiMyc ook in knaagdiermodellen voor auto-immuunziektes CFA kunnen vervangen. Onderzoek hiernaar zal echter in apart uitgevoerd dienen te worden, gezien er geen enkele garantie is dat resultaten in de resus makaak

14.

17. Kerlero de Rosbo, N. et al. (2000) Rhesus monkeys are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein: characterisation of immunodominant T- and B-cell epitopes. *J Neuroimmunol* 110 (1-2), 83-96.

18.

21. Peschl, P. et al. (2017) Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: Deciphering a Target in Inflammatory Demyelinating Diseases. *Front Immunol* 8, 529.

22.

27. Laman, J.D. et al. (2002) Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12). *Eur J Immunol* 32 (8), 2218-28.

36. Pluchino, S. et al. (2009) Human neural stem cells ameliorate autoimmune encephalomyelitis in non-human primates. *Ann Neurol* 66 (3), 343-54.

37. Thiruvalluvan, A. et al. (2016) Survival and functionality of human induced pluripotent stem cell-derived oligodendrocytes in a nonhuman primate model for multiple sclerosis. *Stem Cells Transl Med* 5 (11), 1550-1561.

40. Stimmer L. et al. (2018) Experimental Models of Autoimmune Demyelinating Diseases in Nonhuman Primates. *Vet Pathol.* 55(1):27-41.
41. Jones J.M. et al. (2008) Monkeypox virus viral chemokine inhibitor (MPV vCCI), a potent inhibitor of rhesus macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine.* 43(2):220-8.
42. Teitelbaum D. et al. (2004) Oral glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis: clinical and immunological studies. *Ann N Y Acad Sci.* 1029:239-49.
43. Hu H. et al. (1997) Depletion of T lymphocytes with immunotoxin retards the progress of experimental allergic encephalomyelitis in rhesus monkeys. *Cell Immunol.* 10;177(1):26-34.
44. Rose L.M. et al. (1994) Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in nonhuman primates: a model of multiple sclerosis. *Lab Anim Sci.* 44(5):508-12.
45. Curtis 2nd A.D. et al. (2014) The extracellular domain of myelin oligodendrocyte glycoprotein elicits atypical experimental autoimmune encephalomyelitis in rat and Macaque species. *PLoS One.* 10;9(10):e110048. doi: 10.1371/journal.pone.0110048. eCollection 2014. Erratum in: *PLoS One.* 2015;10(2):e0117878.
46. Inaba S.I. et al. (2016) Evaluation of species difference in peripheral lymphocyte reduction effect of CS-0777, a sphingosine 1-phosphate receptor modulator, based on a pharmacokinetic/pharmacodynamic model analysis. *Biopharm Drug Dispos.* 37(9):561-573.
47. Peng Z. et al. (2018) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Model of Cynomolgus Macaques Induced by Recombinant Human MOG1-125 (rhMOG1-125) Protein and MOG34-56 Peptide. *Protein Pept Lett.* 24(12):1166-1178.
48. Fovet C.M. et al. (2019) Intradermal vaccination prevents anti-MOG autoimmune encephalomyelitis in macaques. *EBioMedicine.* 47:492-505.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk

Een hoog percentage kandidaat geneesmiddelen overleeft de vertaling van diermodel naar MS patiënt niet (>90% voor RR-MS en 100% voor SP- en PP-MS). Een belangrijke oorzaak daarvoor is de kloof tussen de in het preklinisch onderzoek veel gebruikte EAE modellen in knaagdieren en de MS patiënt. De EAE modellen in NHP worden algemeen beschouwd als een relevante overbrugging van deze kloof. De vertaalbaarheid van resultaten verkregen in EAE modellen in knaagdieren wordt negatief beïnvloed door het feit dat alle dieren genetisch zeer nauw verwant zijn (inbred), dat de dieren specific-pathogen free (SPF) gehuisvest zijn (waardoor hun immuunsysteem anders uitrijpt dan wanneer er een normale blootstelling is aan virussen en bacterien), dat er aanmerkelijke verschillen zijn in de neuropathologie met MS, en dat er een grote genetische afstand is met de mens. EAE modellen in non-SPF, outbred NHP vertonen enerzijds grote immunologische overeenkomsten met MS, anderzijds vertonen ze ook grote neuropathologische overeenkomsten met MS. Onderzoek in NHP modellen kan bv. nieuwe inzichten verschaffen in de overgang van de relapsing-remitting naar de progressieve fase van de ziekte, waarvoor op dit moment nog geen enkele effectieve medicatie bestaat. Optimalisatie van de modellen in NHP is daarbij wel noodzakelijk. Vooral vanuit het oogpunt van dierenwelzijn, waarbij het gebruik van CFA ongerief veroorzaakt dat niet ziekte-gerelateerd is. Daarnaast is het zo, alhoewel dat niet het doel is van dit project, dat een milder adjuvant ook mogelijkheden kan bieden om het acute verloop van het rhesus EAE model te temperen, om daarmee het model ook voor andere toepassingen geschikt te maken.

Maatschappelijk

Het maatschappelijk belang van dit project is tweeledig en betreft zowel dier als mens.

Voor de t.b.v. de mens ingezette dieren hebben wij de maatschappelijke verantwoordelijkheid om het ongerief zo klein mogelijk te maken. Vervanging van CFA in het EAE model in de resus makaak door een milder adjuvant met minder of geen bijwerkingen zou het niet-ziekte gerelateerde ongerief voor de

dieren sterk reduceren: een aanzienlijke verfijning. Daarnaast is het zo dat een succesvolle vervanging van CFA in het resus EAE model ook aanleiding zou kunnen geven voor onderzoek naar de mogelijke vervanging van CFA in modellen voor auto-immuunziektes in andere diersoorten, zoals b.v. EAE in marmosets, ratten en muizen en collageen-geïnduceerde artritis in ratten. Het is daarbij nog onduidelijk hoe goed resultaten uit de resus makaak zich laten vertalen naar andere species, en *vice versa*.

Voor de mens is iedere vooruitgang in de behandelingsmogelijkheden van MS een sprong voorwaarts. In Nederland treft de diagnose MS ongeveer 1 op de 1000 mensen. De jaarlijkse kosten voor de zorg en behandeling van deze 17.000 mensen liggen tussen 500 en 700 miljoen euro. De ziekte treft vooral jongvolwassenen en is, na trauma, de belangrijkste oorzaak van neurologische ziekte in jongvolwassenen. MS heeft een enorme impact op de maatschappelijke participatie (werk/sociale contacten) en leidt tot een sterk verminderde kwaliteit van leven. Er is dringend behoefte aan een veilige en effectieve behandeling van MS. De huidige therapieën die ontwikkeld zijn tegen MS werken in een deel van de RR-MS patiënten, maar zijn helaas niet werkzaam in patiënten met SP-MS of PP-MS. Tevens hebben de huidige therapieën veel bijwerkingen zoals terugkerende infecties die langdurig gebruik in de weg staan. Omdat de ziekte een ernstig verloop heeft met blijvende invaliditeit is het zeer belangrijk dat de ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen MS blijft doorgaan.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het uiteindelijke doel van het project is om te testen of MiMyc het gebruik van CFA als adjuvant ter inductie van EAE in resus makaken kan vervangen. Om dit doel te bereiken dient een EAE incidentie van ten minste 80% bereikt te worden, een lagere EAE incidentie leidt tot een sterke toename van de groepsgroottes die nodig zijn voor vergelijkend onderzoek met als gevolg een onbruikbaar diermodel.

Het project is getrapt opgebouwd, en zal bestaan uit één of meerdere EAE studies. De **primaire uitkomst parameter** daarbij is EAE incidentie, en daar worden de studies ook op gepowered (power =0.8). De hypothese die wij zullen testen is dat de EAE incidentie met MiMyc significant hoger is dan de incidentie verkregen bij immunisatie met IFA; **doel 1**. Leidend bij de experimentele opzet is dat in geen van de experimenten CFA gebruikt zal worden, ook niet als positieve controle, en dat er zo veel mogelijk gebruik gemaakt zal worden van historische controles om het aantal ingezette dieren en het veroorzaakte ongerief tot een minimum te beperken.

Het eerste experiment zal een *pilot* experiment zijn om de potentie van MiMyc om pathogene auto-immun reacties te helpen induceren te toetsen. Eén groep resus makaken zal geïmmuniseerd worden met MOG peptide 34-56 (pMOG) in één dosis MiMyc. De EAE incidentie in de historische controle groep van dieren geïmmuniseerd met pMOG in IFA is 0%, waardoor een groepsgrootte van 5 dieren volstaat om tot een significant verschil met de historische controlegroep te komen.

De aard van eventueel volgende experimenten is afhankelijk van de uitkomst van dit experiment.

Mocht immunisatie geleid hebben tot klinische EAE, dan zal de EAE incidentie, in combinatie met eventueel optredende bijwerkingen, leidend zijn voor het verdere verloop van het project. Bij een EAE incidentie van 80% of hoger, dan is het onnodig om vervolgentoetsen met rhMOG in de resus makaak uit te voeren, gezien er dan tevens sprake is van een robuust EAE model; **doel 2**. Bij een lagere EAE incidentie hangt het vervolg van de studie af van de gevonden incidentie (zie bijlage).

In elke studie zullen klinische scores, de pathologie in het CZS, immuunresponsen in bloed en lymfoïde organen, alsmede adjuvant-gerelateerde bijwerkingen gemeten worden.

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

De opbouw van het project is gericht op het verkrijgen van een betrouwbaar antwoord op de vraag of immunisatie met auto-antigeen in MiMyc kan leiden tot vervanging van CFA als adjuvant in het resus makaak EAE model. Leidend bij het opstellen van de onderzoeksstrategie zijn 1) het vermijden van CFA (in een eventuele positieve controlegroep), en 2) de inzet van het minimale aantal dieren, geweest.

In een eerste *pilot* experiment met pMOG willen we testen of MiMyc het potentieel bezit om pathogene auto-immuun reacties te helpen induceren. Mocht een EAE incidentie van minimaal 80% bereikt worden, dan is MiMyc daarmee ook geschikt om CFA als adjuvant in EAE modellen in de resus makaak te vervangen. Mocht de EAE incidentie lager dan 80% zijn, dan zullen vervollexperimenten met pMOG of met rhMOG gedaan worden in een poging om tot een robuust (EAE incidentie van minimaal 80%) model te komen.

Om EAE te induceren worden de dieren intracutaan, dorsaal op 10 plekken geïmmuniseerd met autoantigeen in adjuvant. De immunisatie kan evt. gevolgd worden door maximaal 3 maandelijkse booster immunisaties tot er neurologische symptomen optreden, waarbij een maximale EAE score van 2 gehanteerd wordt. Scores hierboven, of een tijdsduur langer dan 3 dagen met een score van 2, zullen leiden tot een humaan eindpunt. De dieren zullen dagelijks worden geobserveerd op klinische symptomen behorend tot EAE en op mogelijke ontwikkeling van adjuvant-gerelateerde bijwerkingen. Tijdens de dierproef zal er regelmatig bloed worden afgenomen. Aan het eind van de studie of wanneer het humane eindpunt is bereikt, worden de dieren geëuthanaseerd waarna het CZS wordt onderzocht op pathologie en de immuunresponses in de lymfoïde organen worden geanalyseerd.

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.

Het meest frequent gebruikte antigeen voor EAE studies in de resus makaak is MOG. Dit wordt als recombinant humaan eiwit of als peptide geformuleerd in verschillende adjuvantia, met verschillende EAE incidenties tot gevolg (zie Tabel).

Antigeen	EAE incidentie		Historische controles voor IFA aanwezig?	Benodigde dier# voor significant verschil t.o.v. IFA	Drempel voor EAE inductie
	IFA	CFA			
pMOG	0%	80%	JA	5	HOOG
rhMOG	40%	100%	NEE	10	LAAG

Het vermijden van CFA als positieve controle groep heeft tot gevolg dat onze referentiegroep dus de negatieve controlegroep is (IFA). Wanneer pMOG geformuleerd wordt in IFA dan leidt dat nooit tot EAE. Dit in tegenstelling tot rhMOG formulering in IFA, wat leidt tot een EAE incidentie van 40%. De drempel voor EAE inductie ligt dus lager bij gebruik van rhMOG, wat ook te verwachten is gezien de aanwezigheid van meerdere epitopen die een bijdrage kunnen leveren aan pathogene auto-immuunreacties (in tegenstelling tot het pMOG). Daarnaast is bekend dat de hoeveelheid resterende microbiële verontreiniging in rhMOG van batch-tot-batch kan verschillen, wat ook invloed kan hebben op de EAE incidentie, en wat tevens het meenemen van een historische controlegroep onmogelijk maakt.

Ondanks dat de drempel voor EAE inductie hoger ligt bij gebruik van pMOG en dat de kans op succes dus kleiner is, kiezen wij er toch voor om met dit antigeen te starten in een *pilot* experiment. Gezien de aanwezigheid van een historische negatieve controle groep van 5 dieren, volstaat één groep van 5 dieren om te toetsen of MiMyc pathogene auto-immuunresponsen kan helpen induceren. Mocht dat niet zo zijn, dan is het aantal ingezette dieren en het ongerief initieel tot een minimum beperkt gebleven. Mocht dat wel zo zijn, dan is daarmee bewezen dat MiMyc als kandidaat adjuvant, pathogene auto-immuun responsen kan helpen induceren.

Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 40% of lager zijn, dan is daarmee niet bewezen dat MiMyc significant beter pathogene auto-immuunresponsen kan helpen induceren dan IFA. Wij zullen dan minimaal één vervollexperiment uitvoeren met rhMOG als antigeen, waarbij in dit geval wel een extra controle groep nodig is. Er zullen dan twee groepen van 10 dieren met rhMOG geïmmuniseerd worden, één groep met rhMOG geformuleerd in IFA en één groep met rhMOG in MiMyc. Een EAE incidentie van 60% of lager leidt tot het onsuccesvolle einde van de studie. Wanneer de incidentie 70, 80 of 90% is, dan is de strategie om meer dieren met rhMOG te immuniseren om **doel 2** te behalen (en mogelijkkerwijs door de toename van de groepsgrootte ook **doel 1**). Bij een EAE incidentie van 100% (gelijk aan die van rhMOG in CFA) zijn zowel **doel 1** als **doel 2** bereikt.

Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 60% zijn, dan is daarmee nog niet bewezen dat MiMyc significant beter pathogene auto-immuunresponsen kan helpen induceren dan IFA, gezien de relatief kleine groepsgroottes. Aangezien het resultaat wel veelbelovend is, zullen we dan nog 5 dieren immuniseren met pMOG in MiMyc en 5 dieren met pMOG in IFA om zo mogelijkkerwijs wel tot een

significant verschil met IFA te kunnen komen (**doel 1**). Doorrekening leert dat -bij groepsgroottes van dan 10 dieren die geïmmuniseerd zijn met pMOG in IFA en MiMyc- het verschil significant is vanaf 60% incidentie. Mochten alle 5 de dieren die met MiMyc geïmmuniseerd zijn EAE ontwikkeld hebben, dan zou de incidentie daarmee op 80% komen en **doel 2** ook bereikt zijn. Mocht de incidentie 60 of 70% zijn, dan is doel 1 daarmee behaald, en dan zou voor het behalen van **doel 2** immunisatie van één groep van 10 dieren met rhMOG in MiMyc volstaan om de EAE incidentie te kunnen inschatten. De verwachting is dat de EAE incidentie hoger zal zijn dan bij immunisatie met pMOG, waarmee de kans op een incidentie van minimaal 80% -**doel 2**- zeer reëel is. We zijn ons volledig bewust van het gegeven dat de spreiding met het lage aantal gebruikte dieren groot is, maar vertrouwen er op dat wanneer er overgegaan wordt op MiMyc als adjuvant de groepsgrootte zal toenemen doordat in toekomstige experimenten met rhMOG voor andere onderzoeksdoelen CFA vervangen kan worden door MiMyc.

Mocht de EAE incidentie met pMOG in MiMyc 80% of hoger zijn, dan zullen er geen vervolg experimenten met rhMOG nodig zijn omdat het model met pMOG dan robuust genoeg is voor gebruik en daarmee zowel **doel 1** als **doel 2** behaald zijn. We zijn ons bewust van het gegeven dat de spreiding met het lage aantal gebruikte dieren groot is, maar vertrouwen er op dat wanneer er overgegaan wordt op MiMyc als adjuvant de groepsgrootte zal toenemen door toekomstige experimenten met pMOG in MiMyc voor andere onderzoeksdoelen. Mocht het opportuun geacht worden, dan zouden wij zelf eventueel ook extra dieren toe kunnen voegen aan ons *pilot* experiment om zo de spreiding terug te brengen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Testen van een nieuw, mild adjuvant ter vervanging van CFA, in een resus aap diermodel voor auto-immuun geïnduceerde neuroinflammatie
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	