



Formulier Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage 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.
- 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 2.1 aangekruiste categorieën.

Afkortingen:

CMV = cytomegalovirus

CSF = cerebrospinal fluid

CZS = centrale zenuwstelsel

EAE = experimentele auto-immuun encefalomyelitis

EBV = Epstein-Barr virus
IFA = incomplete Freund's adjuvant
MHC = major histocompatibility complex
MS = multiple sclerose
NHP = niet-humane primate
PPMS = primaire progressieve MS
rhMOG = recombinant human myelin oligodendrocyte protein
RRMS = relapsing-remitting MS, klachten worden afgewisseld met herstel
SPMS = secundair progressieve MS

Wat is MS? Multiple sclerose (MS) is een zeer ernstige chronische aandoening die de zenuwbanen in het centrale zenuwstelsel (CZS) aantast. MS is de belangrijkste oorzaak van invaliditeit bij jongvolwassenen, met een incidentie van 1 op 500 in Nederland. Wereldwijd lijden zo'n 2,5 miljoen mensen aan deze ziekte, waarvan meer vrouwen dan mannen. De MS-diagnose kan voorkomen op elke volwassen leeftijd en vindt meestal plaats tussen de 20-50 jaar, maar de hoogste incidentie is rond de 32 jaar. De prevalentie van MS is wereldwijd het hoogst in Amerika en Europa, echter stijgt de prevalentie van MS in alle werelddelen [1]. Daarnaast zijn er ook maatschappelijke belangen, ter illustratie, de kosten van geneesmiddelen voor MS-patiënten zijn alleen al in Nederland in 8 jaar verdubbeld van €99 miljoen in 2012 naar €181 miljoen in 2020, en de kosten stijgen relatief sterker dan de toename van het aantal MS-patiënten [2, 3].

Bij 80% van de mensen met MS volgt de ziekte een 'relapsing-remitting' (RRMS) beloop waarbij episodes met neurologische klachten (relapse) alterneren met gedeeltelijk of zelfs volledig herstel (remissie). Gemiddeld verandert de ziekte rond de leeftijd van 40 jaar naar een progressief beloop (secundair progressieve MS, SPMS) en vindt er nauwelijks herstel plaats. Echter, bij ongeveer 20% van de patiënten openbaart de ziekte zich als progressief vanaf het begin (primaire progressieve MS, PPMS). De belangrijkste vragen in het MS onderzoek, waar wij een bijdrage aan willen leveren, is wat er verandert bij de overgang van RRMS naar SPMS en of we het progressie beloop bij SPMS en PPMS kunnen voorkomen of vertragen.

De meest voorkomende symptomen bij MS zijn ernstige vermoeidheid, tijdelijke blindheid, verminderde mobiliteit, spierzwakte, incontinentie, stijfheid, en onhandigheid en slepen van de benen (meestal asymmetrisch). Uiteindelijk kan de ziekte leiden verlamming van de ledematen. Naast motorische problemen ontstaan er gedurende het verloop van de ziekte ook problemen met geheugen en concentratie, de zogeheten cognitieve problemen, die de kwaliteit van leven ernstig beïnvloeden [4]. 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, overlijden MS patiënten vroegtijdig als gevolg van infecties, zoals een longontsteking.

Oorzaak van MS: De oorzaak van MS is onbekend, maar uit epidemiologische studies blijkt dat de interactie tussen genetische en omgevingsfactoren een belangrijke rol speelt. Genetische studies tonen een bijdrage aan van meer dan 200 genen aan de predispositie voor MS. De overgrote meerderheid van de gevonden genen heeft een functie in het immuunsysteem. Echter, de rol van individuele genen met uitzondering van major histocompatibility complex (MHC) genen is beperkt. Omgevingsfactoren die een rol spelen bij MS zijn onder andere een tekort aan vitamine D, wat mogelijk de wereldwijde geografische verschillen in prevalentie kan verklaren [1], roken, en er is een grote prevalentie van MS-patiënten die infectie met het Epstein-Barr herpesvirus (EBV) hebben doorgemaakt [5, 6]. Het is echter onduidelijk hoe de bijdrage van deze factoren en hun interactie mechanistisch in elkaar zit. De notie dat het immuunsysteem een centrale rol speelt in het ziekteproces maakt het een belangrijk onderwerp van preklinisch onderzoek en ook een doelwit voor therapeutische interventie.

Pathologische aspecten van MS: De pathologie van MS kenmerkt zich door laesies in het ruggenmerg en de hersenen, zowel in de witte als de grijze stof. Er is overactiviteit van de afweercellen van het brein (microglia en astrocyten) en er zijn infiltraten van perifere afweercellen aanwezig (macrofagen, B-cellen en T-cellen). Er is schade aan myeline (demyelinisatie), de isolerende laag rond zenuwuitlopers (axonen), en beschadiging van de axonen zelf. Laesies in de witte stof van het CZS zijn het belangrijkste kenmerk van MS en komen voor in RRMS en de progressieve vormen. Grijze stof laesies zijn een typisch kenmerk van de progressieve fase van de ziekte; deze veroorzaken veel van de cognitieve problemen.

Behandeling: Op dit moment zijn er 18 therapieën officieel goedgekeurd voor RRMS. Dit zijn biologicals als IFN-beta en fingolimod. Antilichamen gericht tegen B-cellen (zoals rituximab, ocrelizumab) of tegen de migratie van lymfocyten naar de hersenen (zoals natalizumab). De afgelopen vijf jaar zijn er slechts 5

nieuwe medicijnen op de markt toegelaten, welke wel bijdragen aan een vertraging van het ziekteverloop maar niet kunnen voorkomen dat de ziekte uiteindelijk verergert. Deze therapieën remmen met name de ontstekingsactiviteit van T-cellen, B-cellen en macrofagen en onderdrukken daarmee het immuunsysteem. De huidige therapieën werken maar in een deel van de patiënten met RRMS [7] en ze voorkomen dus niet de overgang naar de progressieve fase van MS. Ook kunnen er ernstige bijwerkingen ontstaan, zoals heractivatie van virussen en autoimmuun-reacties gericht tegen bijvoorbeeld de schildklier. Daarom zullen ook de komende jaren nog veel nieuwe therapieën tegen MS ontwikkeld en getest moeten worden. Voor de progressieve vormen van MS (SPMS en PPMS) zijn er nog helemaal geen medicijnen beschikbaar. Dit komt doordat de pathogene mechanismes tijdens progressieve MS en ook het precieze verschil met RRMS nog onbekend zijn.

Het EAE model: Een van de best gekarakteriseerde diermodellen voor MS is het experimentele autoimmuun encefalomyelitis (EAE) model; het model is ontwikkeld in ratten, muizen en niet-humane primaten (NHP) [8, 9]. Het EAE muismodel wordt veel gebruikt voor basaal onderzoek en ook het testen van nieuwe kandidaat-geneesmiddelen. Het EAE muismodel heeft in belangrijke mate bijgedragen aan de huidige inzichten in de ziekte mechanismes van MS. In het EAE muismodel zijn diverse therapieën ontwikkeld die gebruikt worden voor de behandeling van RRMS. Bijvoorbeeld de monoclonale antistof natalizumab, die intrede van afweercellen in het CZS blokkeert. Er is echter een lange lijst van veelbelovende kandidaat geneesmiddelen die vertaling van diermodel naar MS-patiënt niet hebben overleefd vanwege onverwachte toxiciteit of een gebrek aan werkzaamheid in mensen. Het EAE muismodel is zeer bruikbaar voor toegepast onderzoek aan bepaalde facetten van MS, met name de rol van ontstekingscellen, maar door fundamentele verschillen met de mens, waaronder de afwezigheid van immunologische mechanismes die werkzaam zijn in MS, is het muismodel niet goed bruikbaar is voor ontwikkeling van geneesmiddelen hierin kan het EAE model in de marmoset een uitkomst bieden.

De belangrijkste verschillen tussen het EAE model in muizen en MS-patiënten zijn:

- In 'EAE muizen' zitten de laesies alleen in het ruggenmerg, terwijl in MS de laesies voornamelijk voorkomen in de hersenen.
- Laesies in 'EAE muizen' zijn minder complex dan laesies in MS-patiënten [10].
- Er is een verschil wat betreft het afweermecanisme dat tijdens de ziekte een rol speelt: in het EAE-muismodel spelen voornamelijk de CD4+ T-helper cellen een rol, terwijl in MS CD8+ killer T cellen belangrijker lijken te zijn en er ook een grote rol voor B-cellen lijkt te zijn weggelegd.

Deze drie aspecten worden wel teruggevonden in het marmoset EAE model waardoor er mogelijk een grotere translatie mogelijk is van kandidaatgeneesmiddelen naar mensen met multiple sclerose.

De common marmoset (*Callithrix jacchus*), ook wel het penseelaapje genoemd, is een belangrijk diermodel voor onderzoek naar humane ziektes [11], waaronder MS. Het EAE model in de huidige sterk verfijnde vorm is het resultaat van een stapsgewijs reductionistisch proces en heeft zich de afgelopen twee decennia ontwikkeld tot een zeer solide, relevant en goed gevalideerd preklinisch model voor MS [12-16].

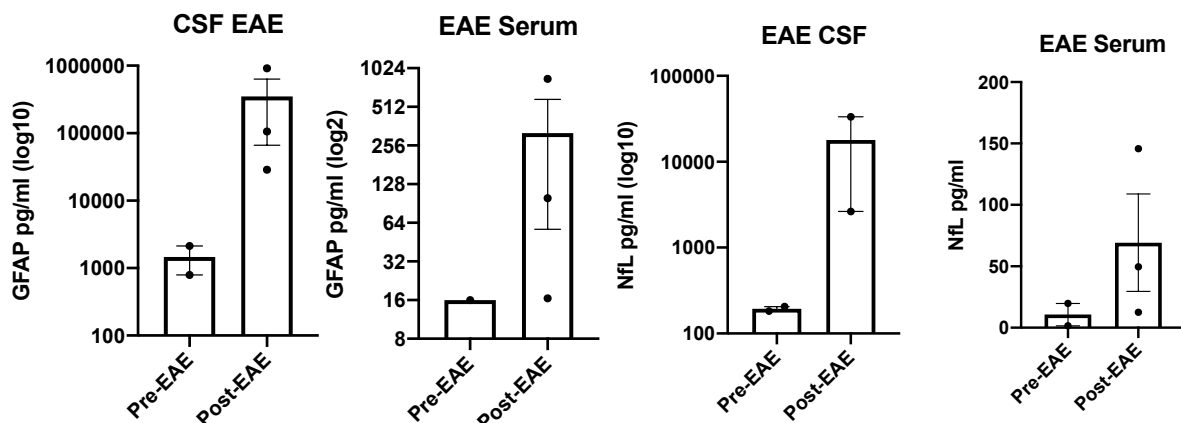
Unieke eigenschappen van het marmoset EAE model t.o.v. het muis EAE model:

- Een direct gevolg van de verfijning van het uitgebreide marmoset EAE model is dat het effect van de genetische heterogeniteit tot uitdrukking komt in een grotere variatie in de respons op de immunisatie en de respons op behandeling. Een dergelijke variatie wordt ook gezien bij MS-patiënten. Dit effect kan indien gewenst worden gecompenseerd door studies op te zetten in beenmerg chimere tweelingen, die ondanks genetische verschillen immunologisch sterk vergelijkbaar zijn. Marmosets worden altijd geboren als beenmerg chimere tweelingen, deze tweelingen ontstaan doordat de placenta tijdens de zwangerschap fuseert, hierdoor is er een circulatie van cellen die uit het beenmerg ontstaan tussen de twee foetussen. De nakomelingen delen dus voor een gedeelte hun immuunsysteem met elkaar terwijl ze wel een genetisch verschillende achtergrond hebben [17]. Indien gewenst kunnen studies opgezet worden waarbij er een deel van de tweeling een controlepreparaat en een andere de therapie krijgt.
- Muismodellen maken gebruik van inbred muiskolonies waardoor de genetische achtergrond van de muizen niet divers genoeg is om MS-patiënten te vertegenwoordigen.

- Er is pathologie in zowel de hersenen als het ruggenmerg. Bij muis EAE-model vindt de pathologie alleen plaats in het ruggenmerg, terwijl bij mensen met MS de laesies voornamelijk voorkomen in de hersenen.
- Er zijn laesies niet alleen in de witte stof, maar ook in de grijze stof van de hersenen, waardoor het marmoset EAE model te gebruiken is als model voor progressieve MS [18]. Bij het muis EAE model worden de laesies in het ruggenmerg gevonden.
- Door de immunologisch goed-ontwikkelde marmoset kan EAE geïnduceerd worden met recombinant humaan myeline oligodendrocyt glycoproteïne (rhMOG) in combinatie met het veel mildere incompleet Freund's adjuvant (IFA), vergeleken met de sterke bacteriële adjuvantia zoals compleet Freund's adjuvant en Bordetella pertussis (toxine), die worden gebruikt in het muismodel. Deze verfijning impliceert niet alleen een aanmerkelijke reductie van het ongerief van ziekte-inductie door immunisatie voor het dier, maar levert ook een veel relevanter model op voor translationele studies naar de pathogenese en behandeling van MS dan de knaagdiermodellen [14, 19-21].
- Voor wat omgevingsfactoren betreft ondersteunt ons onderzoek in het marmoset model voor MS het concept dat infectie met bepaalde herpesvirussen (CMV en EBV) hyperreactiviteit van het immuunsysteem tegen myeline eiwitten induceert [22, 23]. Dit is ook gebleken doordat een dieetverandering gebaseerd op yoghurt de ziekte-incidentie van het EAE model verlaagt naar 65% [16]. Deze dieetverandering was gecorreleerd met een verlaging van de hoeveelheid herpesvirussen in het microbioom van de marmoset [16]. De verfijning zoals hierboven beschreven is gebaseerd op de reactivatie van effector-geheugen T cellen in het immuunrepertoire van de niet-humane primate.
- Het marmoset EAE model heeft een chronisch beloop; een gemiddeld experiment duurt 100-120 dagen en er kan zeer regelmatig bloed worden afgenomen voor immuun-profilering. Hierdoor kan het effect van een kandidaat-geneesmiddel op de langere termijn worden gevolgd. Ook kan de pathologie over de tijd gevolgd worden door visualisatie m.b.v. een MRI of PET-CT, zoals bij de mens ook het geval is.

Andere belangrijke eigenschappen van het marmoset EAE model:

- De klinische symptomen van MS zijn goed terug te zien in het model, o.a. evenwichtsstoornissen en (in)complete verlamming.
- De laesies in het marmoset EAE model worden gekarakteriseerd door oxidatieve schade en redistributie van ijzer afkomstig uit oligodendrocyten. Deze patronen zijn sterk vergelijkbaar met MS [16].
- Anders dan bij mensen kan je met het gebruik van een diermodel de ziekte op eerdere tijdstippen dan het eindstadium bestuderen. De laesies ontwikkelen zich in het marmoset model in de hersenen, terwijl bij muizen ze zich alleen in het ruggenmerg ontwikkelen. Op deze manier kan er onderzoek gedaan worden naar de pathogenese van MS in de hersenen zoals bij mensen ook het geval is, het pathologische ziekteverloop en de ontwikkeling van de laesies in het CZS. Dergelijk onderzoek draagt bij aan de kennis over MS en kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe therapieën.
- Een belangrijk voordeel van het marmoset EAE model is dat een multi-compartmentale immuunprofilering kan worden gedaan (Figuur 1).



Figuur 1. CSF en Serum bepaling van GFAP en NfL in niet humane primaten voor en na EAE.

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) en neurofilament – light (NfL) zijn cytoskelet eiwitten uit hersencellen, die in het bloed en CSF gemeten kunnen worden bij mensen zodra er hersenschade is opgetreden, zoals ook bij neurodegeneratieve ziektes zoals MS [24]. Onze pilotdata laat zien dat we deze parameters ook toe kunnen passen in het marmoset model.

Samenvatting van de immunopathogenese van het marmoset EAE model:

Het marmoset EAE model wordt gebruikt voor translationeel onderzoek. Translationeel onderzoek in het marmoset EAE model geeft niet alleen antwoord op de effectiviteit van een nieuwe therapie maar leidt ook tot inzichten in het model, in MS, en in het werkingsmechanisme van de therapie. Het hier voorgestelde onderzoek is een voortzetting van vergunning AVD50200201788. Belangrijke inzichten werden verkregen door een kritische evaluatie van therapieën die goed werkzaam waren in MS, terwijl andere therapieën faalden. Bijvoorbeeld, in RRMS werkt de monoclonale antistof (ustekinumab) tegen de T-cel specifieke signaalmoleculen IL-12 en IL-23 niet. Dit kan mogelijk worden verklaard doordat de ziekte wordt voortgedreven door effector geheugen T cellen die niet gevoelig zijn voor IL-12 en IL-23.

Verder onderzoek gaf een mechanistische verklaring voor de slecht begrepen effectiviteit in RRMS van een monoclonaal antistof (rituximab) dat een ander type lymfocyt remt, de CD20+ B-cel. Wij vonden in het marmoset model dat niet alleen witte stof laesies maar ook grijze stof laesies voorkomen kunnen worden door B-cel depletie [25]. Dit is in mensen zeer lastig te onderzoeken omdat grijze stof laesies minder goed te zien zijn op MRI. Verder bleek uit een uitgebreide analyse van secundaire lymfoïde organen (milt en lymfeklieren) T-cellen een signaal krijgen van B-cellen waardoor ze uit lymfoïde organen migreren. Als de B-cel populatie wordt uitgeput blijven T-cellen in de milt of lymfeklieren in plaats van te migreren naar de hersenen [26]. Deze B-cel depletiestudies toonden aan dat B-cellen die geïnfecteerd zijn met een marmoset-specifiek lymfocryptovirus (welke verwant is aan EBV) een cruciale rol spelen in het model. Behandeling met een anti-CD20 antilichaam voorkwam evenals in MS de ontwikkeling van klinische symptomen en pathologie [27, 28]. In deze dieren was ook geen DNA van het lymfocryptovirus in lymfeklieren en milt meer te vinden. Deze en andere hier niet besproken waarnemingen tonen aan dat er juist depletie moet zijn van B-cellen met het lymfocryptovirus om een effect te zien op de klinische symptomen en pathologie [29-31]. Bovendien werd geobserveerd, toen de marmosets in de BPRC kolonie op een ander dieet gezet werden, dat de ziekte-incidentie van het EAE model drastisch omlaag ging (van 100% naar 65%). Hierna zijn de dieren weer op een ander dieet (EAZA) gezet om de incidentie weer omhoog te krijgen, deze was bij het laatste experiment met het EAZA-dieet 75%. Hieruit is gebleken dat belangrijke factoren in het dieet kunnen zorgen voor een verlaging van het lymfocryptovirus en dat dit mogelijk kan leiden tot een verlaagde kans op het ontwikkelen van EAE [16]. Het nieuwe EAZA-dieet is opgesteld naar de nieuwste richtlijnen voor Callithridae door de European Association of Zoos and Aquarias (EAZA). Dit dieet bevat geen yoghurt en lage levels van vitamine B maar weer meer groentes en Arabische gom. Het EAZA dieet is dan ook meer gebaseerd op natuurlijke voeding in het wild [32].

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Het directe doel van dit project is om de effectiviteit en het mechanisme van kandidaat-geneesmiddelen tegen MS te bepalen in het diermodel voor MS, namelijk EAE in de marmoset. Het uiteindelijke doel is het in de kliniek brengen van nieuwe therapieën voor de behandeling van MS.

Het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen:

1. Farmacokinetiek/farmacodynamiek van kandidaat-geneesmiddelen testen.
2. Evaluatie effectiviteit van te testen kandidaat-geneesmiddelen

Met het directe doel kunnen we bepalen of een geneesmiddel geschikt is voor de behandeling van MS, welke dosis mogelijk effectief is en wat de verwachtingen zijn rondom het verbeteren van pathologie en ziektesymptomen.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

Het instituut waar deze studies zullen worden uitgevoerd heeft beschikking over marmosets uit een eigen marmoset fokkolonie. Op het instituut is de infrastructuur en de expertise aanwezig om deze studies veilig, op DM-2 en ML-2 niveau, en binnen de gestelde termijn uit te voeren.

Het instituut heeft in de afgelopen 20 jaar grote expertise opgebouwd op het gebied van het uitvoeren van vergelijkbare studies in het EAE model. Het marmoset EAE model is o.a. gebruikt voor het testen van IFN-gamma [33] en antilichamen tegen IL-12p40 [34, 35], CD40 [36, 37], IL-17A [38], CD20 [25, 27, 28], IL-7 receptor (CD127) [39] en antilichamen tegen de B-cel groeifactoren BLYS en APRIL [40]. Ook is onderzocht of tolerantie geïnduceerd kan worden met een fusie-eiwit dat gebruik maakt van het cholera toxine subunit en een Ig bindende regio van staphylococcus aureus eiwit [41]. Het model is gebruikt om de haalbaarheid van stamceltherapie te onderzoeken; dit betrof neurale stamcellen [42] en geïnduceerde pluripotente stamcellen [43]. Ook is het model gebruikt om de effecten van dieet te onderzoeken op de ernst van het ziektebeloop [16]. Hierbij is gebleken dat de ziekte-incidentie van het EAE-model omlaag gaat als de marmosets worden gevoerd met een yoghurt supplement[16].

De primaire uitkomstparameter (ontwikkelen van EAE) wordt gebruikt in combinatie met de incidentie van EAE en de verwachte effectiviteit van een therapie/medicijn om de groepsgroottes te bepalen. Deze groepsgroottes worden berekend door een poweranalyse op basis van het relatieve risico om EAE te ontwikkelen of de hazard ratio, de tijd tot het ontwikkelen van EAE.

Referenties bij 3.1 en 3.2

1. Walton, C., et al., *Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition*. Multiple Sclerosis Journal, 2020. **26**(14): p. 1816-1821.
2. Nederland, Z. *Monitor MS-geneesmiddelen*. 2019; Available from: <https://www.zorginstituutnederland.nl/binaries/zinl/documenten/rapport/2019/06/13/monitor-ms-geneesmiddelen/Monitor+MS+geneesmiddelen+2019.pdf>.
3. Nederland, Z. *Factsheet - Gebruikers, uitgaven en switchen MS-geneesmiddelen 2012-2020*. 2022; Available from: <https://www.zorginstituutnederland.nl/binaries/zinl/documenten/publicatie/2022/05/25/factsheet-ms-middelen/Factsheet+MS-geneesmiddelen+in+basispakket.pdf>.
4. Thompson, A.J., et al., *Multiple sclerosis*. Lancet, 2018. **391**(10130): p. 1622-1636.
5. Baecher-Allan, C., B.J. Kaskow, and H.L. Weiner, *Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy*. Neuron, 2018. **97**(4): p. 742-768.
6. Bjornevik, K., et al., *Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis*. Science, 2022. **375**(6578): p. 296-301.
7. Mamoei, S., et al., *A cross-sectional comparison of performance, neurophysiological and MRI outcomes of responders and non-responders to fampridine treatment in multiple sclerosis - An explorative study*. J Clin Neurosci, 2020. **82**(Pt A): p. 179-185.
8. Gold, R., C. Linington, and H. Lassmann, *Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research*. Brain, 2006. **129**(Pt 8): p. 1953-71.
9. Friese, M.A., et al., *The value of animal models for drug development in multiple sclerosis*. Brain, 2006. **129**(Pt 8): p. 1940-52.
10. Schuh, C., et al., *Oxidative tissue injury in multiple sclerosis is only partly reflected in experimental disease models*. Acta Neuropathol, 2014. **128**(2): p. 247-66.
11. Han, H.J., S.J. Powers, and K.L. Gabrielson, *The Common Marmoset-Biomedical Research Animal Model Applications and Common Spontaneous Diseases*. Toxicol Pathol, 2022. **50**(5): p. 628-637.
12. Kap, Y.S., J.D. Laman, and B.A. t Hart, *Experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset, a bridge between rodent EAE and multiple sclerosis for immunotherapy development*. J Neuroimmune Pharmacol, 2010. **5**(2): p. 220-30.
13. t Hart, B.A., et al., *The primate autoimmune encephalomyelitis model; a bridge between mouse and man*. Ann Clin Transl Neurol, 2015. **2**(5): p. 581-93.
14. Kap, Y.S., et al., *The common marmoset as an indispensable animal model for immunotherapy development in multiple sclerosis*. Drug Discov Today, 2016. **21**(8): p. 1200-5.
15. t Hart, B.A., *Experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset: a translationally relevant model for the cause and course of multiple sclerosis*. Primate Biol, 2019. **6**(1): p. 17-58.
16. Kap, Y.S., et al., *Targeted Diet Modification Reduces Multiple Sclerosis-like Disease in Adult Marmoset Monkeys from an Outbred Colony*. J Immunol, 2018. **201**(11): p. 3229-3243.

17. Genain, C.P. and S.L. Hauser, *Experimental allergic encephalomyelitis in the New World monkey Callithrix jacchus*. Immunol Rev, 2001. **183**(1): p. 159-72.
18. Donadieu, M., et al., *Ultra-high-resolution MRI Reveals Extensive Cortical Demyelination in a Nonhuman Primate Model of Multiple Sclerosis*. Cereb Cortex, 2021. **31**(1): p. 439-447.
19. t Hart, B.A., *Why does multiple sclerosis only affect human primates?* Mult Scler, 2016. **22**(4): p. 559-63.
20. Jagessar, S.A., et al., *Immune profile of an atypical EAE model in marmoset monkeys immunized with recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein in incomplete Freund's adjuvant*. J Neuroinflammation, 2015. **12**(1): p. 169.
21. Haanstra, K.G., et al., *Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis with recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein in incomplete Freund's adjuvant in three non-human primate species*. J Neuroimmune Pharmacol, 2013. **8**(5): p. 1251-64.
22. Vanheusden, M., et al., *Cytomegalovirus: a culprit or protector in multiple sclerosis?* Trends Mol Med, 2015. **21**(1): p. 16-23.
23. t Hart, B.A. and Y.S. Kap, *An essential role of virus-infected B cells in the marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis model*. Mult Scler J Exp Transl Clin, 2017. **3**(1): p. 2055217317690184.
24. Ayrygnac, X., et al., *Serum GFAP in multiple sclerosis: correlation with disease type and MRI markers of disease severity*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 10923.
25. Kap, Y.S., et al., *B-cell depletion attenuates white and gray matter pathology in marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuropathol Exp Neurol, 2011. **70**(11): p. 992-1005.
26. Kap, Y.S., et al., *CD20+ B cell depletion alters T cell homing*. J Immunol, 2014. **192**(9): p. 4242-53.
27. Kap, Y.S., et al., *Late B cell depletion with a human anti-human CD20 IgG1kappa monoclonal antibody halts the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in marmosets*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 3990-4003.
28. Jagessar, S.A., et al., *B-cell depletion abrogates T cell-mediated demyelination in an antibody-nondependent common marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis model*. J Neuropathol Exp Neurol, 2012. **71**(8): p. 716-28.
29. Anwar Jagessar, S., et al., *The different clinical effects of anti-BLyS, anti-APRIL and anti-CD20 antibodies point at a critical pathogenic role of gamma-herpesvirus infected B cells in the marmoset EAE model*. J Neuroimmune Pharmacol, 2013. **8**(3): p. 727-38.
30. t Hart, B.A., et al., *The Primate EAE Model Points at EBV-Infected B Cells as a Preferential Therapy Target in Multiple Sclerosis*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 145.
31. t Hart, B.A., J.D. Laman, and Y.S. Kap, *Merits and complexities of modeling multiple sclerosis in non-human primates: implications for drug discovery*. Expert Opin Drug Discov, 2018. **13**(5): p. 387-397.
32. Ruivo, E.B., *EAZA Best practice guidelines for Callitrichidae*. 3.1 ed. 2017: Beauval Zoo, Saint Aignan, France.
33. Jagessar, S.A., et al., *Discrepant effects of human interferon-gamma on clinical and immunological disease parameters in a novel marmoset model for multiple sclerosis*. J Neuroimmune Pharmacol, 2012. **7**(1): p. 253-65.
34. Brok, H.P., et al., *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets using an anti-IL-12p40 monoclonal antibody*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6554-63.
35. t Hart, B.A., et al., *Suppression of ongoing disease in a nonhuman primate model of multiple sclerosis by a human-anti-human IL-12p40 antibody*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4761-8.
36. Laman, J.D., et al., *Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12)*. Eur J Immunol, 2002. **32**(8): p. 2218-28.
37. t Hart, B.A., et al., *Treatment with chimeric anti-human CD40 antibody suppresses MRI-detectable inflammation and enlargement of pre-existing brain lesions in common marmosets affected by MOG-induced EAE*. J Neuroimmunol, 2005. **163**(1-2): p. 31-9.
38. Kap, Y.S., et al., *Effects of early IL-17A neutralization on disease induction in a primate model of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmune Pharmacol, 2011. **6**(3): p. 341-53.
39. Dunham, J., et al., *Blockade of CD127 Exerts a Dichotomous Clinical Effect in Marmoset Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. J Neuroimmune Pharmacol, 2016. **11**(1): p. 73-83.
40. Jagessar, S.A., et al., *Antibodies against human BLyS and APRIL attenuate EAE development in marmoset monkeys*. J Neuroimmune Pharmacol, 2012. **7**(3): p. 557-70.
41. Kap, Y.S., et al., *Immune modulation by a tolerogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)10-60 containing fusion protein in the marmoset experimental autoimmune encephalomyelitis model*. Clin Exp Immunol, 2015. **180**(1): p. 28-39.
42. Pluchino, S., et al., *Human neural stem cells ameliorate autoimmune encephalomyelitis in non-human primates*. Ann Neurol, 2009. **66**(3): p. 343-54.
43. Thiruvalluvan, A., et al., *Survival and Functionality of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Oligodendrocytes in a Nonhuman Primate Model for Multiple Sclerosis*. Stem Cells Transl Med, 2016. **5**(11): p. 1550-1561.
44. t Hart, B.A., et al., *The marmoset monkey: a multi-purpose preclinical and translational model of human biology and disease*. Drug Discov Today, 2012. **17**(21-22): p. 1160-5.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

X Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Wetenschappelijk: Een hoog percentage van de kandidaat geneesmiddelen overleeft de vertaling van knaagdiermodel naar de MS-patiënt niet (> 90% voor RRMS en 100% voor SPMS en PPMS). Hieruit blijkt hoe beperkt onze kennis nog is van de onderliggende ziektemechanismes. Een belangrijke oorzaak is de immunologische en genetische kloof tussen de in het preklinisch onderzoek gebruikte EAE modellen in knaagdieren en de immunologisch complexe MS-patiënt. Er is dringend behoefte aan een relevant diermodel dat deze kloof kan overbruggen. Het marmoset EAE model wordt algemeen beschouwd als een zeer relevante overbrugging, enerzijds vanwege de immunologische overeenkomst met zowel muizen EAE als met MS, anderzijds vanwege de grote pathologische overeenkomsten met MS zoals hierboven beschreven. De marmoset is genetisch, neuro-anatomisch, immunologisch en fylogenetisch meer verwant met de mens dan een knaagdier. Onderzoek in het marmoset EAE model kan belangrijke nieuwe inzichten verschaffen in de overgang van RRMS naar SPMS en de progressie van SPMS en PPMS, waarvoor op dit moment nog geen enkele effectieve medicatie bestaat. Doordat de marmoset fylogenetisch dichter bij de mens staat is de kans groter dat kandidaat-geneesmiddelen op een gelijke wijze werken zoals in de mens. Door de zorgvuldige opslag van weefsel dat wordt verzameld van het EAE model kunnen nieuwe inzichten in de pathologie en progressie van de ziekte snel bekeken en met nieuwe technieken getest worden.

Maatschappelijk: In Nederland leven ongeveer 34.000 mensen met MS, dat is 1 op de 500 mensen, en is een veel hogere incidentie dan eerder werd gedacht [2, 3]. De ziekte treft vooral jongvolwassenen en is de meest voorkomende oorzaak van neurologische ziekte in deze leeftijdsgroep. MS heeft een sterke impact op de maatschappelijke participatie (werk/sociale contacten). Mensen met MS kunnen door het progressieve verlies van neurologische functies een aanzienlijk verminderde kwaliteit van leven ervaren. Daarnaast lopen de kosten van geneesmiddelen voor MS-patiënten in Nederland sneller op dan de toename van het aantal patiënten. Daarnaast is er een wereldwijde toename in de prevalentie van MS-patiënten. Er is dringend behoefte aan een effectieve, veilige en adequate behandeling van MS. De huidige therapieën die ontwikkeld zijn voor MS werken niet in alle RRMS-patiënten, en werken niet in SPMS of PPMS. Daarnaast hebben de huidige therapieën veel bijwerkingen waardoor patiënten moeten stoppen met therapie. Omdat de ziekte een ernstig verloop heeft met blijvende invaliditeit en hersenschade, is het zeer belangrijk dat de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor MS blijft doorgaan. Een belangrijk probleem is de lage translationele waarde en voorspelbaarheid voor succes van kandidaat geneesmiddelen in MS-patiënten die worden onderzocht in preklinische muis EAE-modellen. Meer dan 90% van de kandidaat geneesmiddelen sneuvelt in de vertaling van het knaagdiermodel naar MS-patiënt [44]. Doordat de marmoset fylogenetisch dichter bij de mens staat is de kans groter dat kandidaat-geneesmiddelen op een gelijke wijze werken zoals in de mens. Het marmoset EAE model kan daar aan bijdragen: enerzijds door het testen van de effectiviteit van nieuwe medicijnen, maar anderzijds doordat onderzoek in het model informatie oplevert over de werking van medicijnen. Daarnaast kan het fundamentele en mechanistische onderzoek leiden tot nieuwe inzichten en aangrijpingspunten voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën en behandelwijzen.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

De MS-patiënten hebben belang in het project. De MS-patiënten hebben er baat bij dat er nieuwe therapieën worden ontwikkeld en zo goed mogelijk getest worden, voordat deze de mens in gaan. De nieuwe therapieën kunnen ertoe leiden dat MS-patiënten symptoom vrij verder kunnen leven en in sommige gevallen zelfs een verbetering in kwaliteit van leven kunnen ervaren.

De bedrijven die de therapieën ontwikkelen hebben er baat bij dat hun therapie goed getest wordt en schadevrij en zonder toxische gevolgen door patiënten gebruikt kan worden. Daarnaast kan het werkingsmechanisme van therapieën onderzocht worden en met deze kennis kunnen bestaande therapieën geoptimaliseerd worden, of nieuwe therapieën worden ontwikkeld.

De onderzoekers hebben belang in dit project. De resultaten kunnen leiden tot wetenschappelijke publicaties en betere naamsbekendheid in het onderzoeksgebied.

De marmosets zijn belanghebbenden in dit project. Hun integriteit wordt aangetast door het gebruik als diermodel waardoor ze ongerief ondervinden en uiteindelijk gedood worden. Ze hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

Het project zal bestaan uit meerdere EAE studies. Voor translationeel en toegepast onderzoek naar de werking van medicijnen dient er per studie één groep als controle en één of meerdere groepen als testgroep en deze zullen worden behandeld met de te testen therapie. De therapie kan getest worden door middel van twee behandelingsopties: 1. Preventief: hierbij begint de behandeling voor de ziekte-inductie of 2. Therapeutisch: hierbij begint de behandeling na de ziekte-inductie. In elke studie zal gekeken worden naar de klinische score, de pathologie in het CZS en naar de immunologische reactie in bloed en lymfoïde organen.

De therapieën moeten aan de volgende criteria voldoen alvorens ze worden getest in de marmoset voor farmacokinetiek en dynamiek of in het marmoset EAE-model:

1. De therapie mag niet toxisch zijn. Vóórdat een therapie in het aapmodel wordt gebruikt moet het eerst uitgebreid *in vitro* (celkweek) of in lagere proefdieren, zoals muis/rat, getest zijn op de afwezigheid van toxiciteit en inductie van ernstig ongerief.
2. De therapie is ontwikkeld voor een humaan doel/target, maar zal ook kruisreactief moeten zijn met het doel in de marmoset.
3. De therapie moet preklinisch *in vivo* of *in vitro* mechanistisch belovende resultaten laten zien die van belang zijn om de ontwikkeling en/of de progressie van multiple sclerose te kunnen stoppen/verminderen. De effectiviteit van de therapie moet *in vitro* of *in vivo* zijn aangetoond op processen die relevant zijn om de ontwikkeling en/of de progressie van multiple sclerose te kunnen stoppen/verminderen.
4. De therapie moet specifiek zijn voor primaten en daardoor niet in een lagere diersoort getest kunnen worden of de therapie kan niet afdoende worden getest in een andere diersoort vanwege het niet-representatief zijn van deze diermodellen voor de specifieke therapie.

Alle criteria moeten voor elke therapie onderbouwd en gemotiveerd worden voordat deze in overweging worden genomen voor het testen van de therapie in het marmoset EAE-model

Farmacokinetiek/farmacodynamiek in de marmoset:

Voor dit experiment zal één of zullen meerdere concentraties van de therapie eenmalig of herhaaldelijk worden toegediend aan de marmoset. Vervolgens zullen er herhaaldelijke bloedafnames gedaan worden. Uit deze bloedafnames kan informatie gehaald worden over de te gebruiken dosis en/of toedieningsschema om het medicijn te testen tijdens de evaluatie van de therapie in het marmoset EAE-model.

Therapie evaluatie in het marmoset EAE-model:

De marmoset-aper worden geïmmuniseerd met rhMOG/IFA en zullen dagelijks worden geobserveerd op klinische symptomen behorend bij EAE. Tijdens de dierproef zal er regelmatig bloed worden afgenomen. Mogelijk zal er beeldvorming (MRI, PET-CT) uitgevoerd worden tijdens de studie voor extra informatie over het pathologische proces. MRI en/of PET-CT kan extra informatie geven over het brein door visualisatie van hersenstructuren, verlies van myeline, het ontstaan van laesies maar ook belangrijke processen zoals inflammatie. Hierdoor kan longitudinaal onderzocht worden of medicijnen de inflammatie verminderen tijdens het ziekteverloop in plaats van slechts post mortem inflammatie te kunnen bestuderen. Aan het eind van de studie of wanneer het humane eindpunt (incomplete verlamming van 2 ledematen) is bereikt, worden de dieren gedood waarna het CZS wordt onderzocht op de pathologie behorende bij EAE. In de lymfoïde organen wordt de immuunrespons onderzocht. Daarnaast wordt er gekeken naar de werking van de therapie, door de kwantificatie van de weefsels, zoals de activatie van het aangeboren immuunsysteem en hoeveelheid myeline in het CNS.

Een belangrijk voorwaarde om therapieën succesvol te testen in het marmoset EAE-model is de incidentie van het ontwikkelen van EAE-symptomen. Tijdens de vorige vergunning (AVD50200201788) is een incidentie gemeten van 75% met het EAZA-dieet. Echter is deze incidentie bepaald op basis van slechts 1 dierproef, hierdoor is er de mogelijkheid dat de incidentie lager (of hoger) uit kan vallen dan 75%. Echter kan de huidige incidentie pas onderzocht worden na het inzetten van de eerste dierproef, om te voorkomen dat de dierproef wordt uitgevoerd en er geen resultaten uit behaald kunnen worden (door een eventueel lagere incidentie) zal voor de eerste dierproef hier rekening mee worden gehouden. Ofwel: voor de eerste dierproef zullen er meer dieren (maximaal n = 14 per groep) gebruikt worden (uitgaande van een incidentie van 60%) om een eventuele lagere incidentie te ondervangen. De daarop volgende dierproeven zullen vervolgens ingezet worden met de incidentie die is gebleken uit deze dierproef. Indien de incidentie lager uitvalt dan 60% (en hiervoor geen andere duidelijke reden voor kan worden aangetoond) zal worden besloten dat de huidige inductie van EAE met het EAZA-dieet niet betrouwbaar genoeg is en zullen de dierproeven met EAE worden stopgezet.

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Een therapie kan meteen in het marmoset EAE-model getest worden als er uit eerdere *in vitro* of *in vivo* studies een indicatie is voor de te testen concentratie en toedieningsschema (Bijlage 2). Als dit niet het geval is kan er voorafgaand aan een therapie evaluatie eerst een farmacokinetiek en/of farmacodynamiek experiment in de marmoset nodig zijn om de dosis en/of toedieningsschema te bepalen (Bijlage 1).

Omdat er nog geen therapieën zijn voor MS waarbij mensen genezen, is het van belang nieuwe targets voor therapie te ontwikkelen. Om nieuwe targets te vinden die mogelijk gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën is het noodzakelijk dat er onderzoek gedaan wordt naar de ontstaanswijze van de ziekte MS. Het marmoset EAE-model ontleent zich hiervoor door op een relatief vroeger stadium de ziekte te kunnen onderzoeken dan het eindstadium zoals het geval is bij mensen.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Farmacokinetiek/Farmacodynamiek van kandidaatgeneesmiddelen voor multiple sclerose in de marmoset
2	Therapie evaluatie in het marmoset EAE model.
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	