



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.

Het wereldwijde probleem en de uitdaging voor de volksgezondheid

De recent uitgebroken SARS-CoV2 epidemie uitgezonderd, is ziekte ten gevolge van besmetting met *Mycobacterium tuberculosis* al jaren doodsoorzaak nummer 1 ten gevolge van één enkel infectieus organisme. In haar meest recente *Global TB Report* rapporteert de wereldgezondheidsorganisatie (WHO) een geschatte 1,3 miljoen dodelijke tuberculose slachtoffers over het jaar 2020. [1] Daar komen nog eens 214.000 sterfgevallen bij onder HIV-geïnficeerden. Naar schatting ook, is een kwart van de wereldbevolking asymptomatisch (latent) geïnficeerd. Deze grote groep dragers vormt een risico als permanent reservoir voor nieuwe uitbraken van ziekte en transmissie.

Ten aanzien van de behandeling van TB geldt dat 85 tot 90% geneest na toediening van een cocktail van antibiotica. De behandeling duurt echter maanden en gaat gepaard met vaak ernstige bijwerkingen. Desondanks reactiveert de ziekte in 10 tot 15% van de gevallen binnen een jaar na beëindiging van de behandeling. Daarbij is toenemende antimicrobiële resistentie (AMR) een zorgelijke ontwikkeling, die met effectievere therapie en betere preventie bestreden kan worden. De huidige tweedelijns antibiotica vergen een nog langere behandelperiode, met alle gevolgen van dien voor mogelijk ernstige bijwerking, menselijk lijden en economisch verlies. Incidentie van multiële of extreme drug-resistente (MDR/XDR) TB overlapt opvallend genoeg niet met die van reguliere, drug-sensitieve tuberculose. MDR- en XDR-TB zijn met name ook frequent in de oostelijke regionen van het Europese WHO-gebied. [1] Bovendien is behandeling niet effectief in het doorbreken van de transmissiecyclus. Een meest kosteneffectieve aanpak van TB zou worden bereikt met verbeterde preventie ter voorkoming van infectie, ziekte en verspreiding. [2]

Naast eerdergenoemde HIV co-infectie worden diverse risicofactoren voor de ontwikkeling van tuberculose onderkend, waaronder ondervoeding, diabetes, roken, veroudering en immuun-suppressie. Toch schiet onze kennis tekort ten aanzien van de aard en samenhang van mechanismen die het verschil maken tussen resistentie versus aperte infectie- en ziektegevoeligheid. Deze hiaten in onze kennis, maken dat de ontwikkeling van nieuwe preventie- en behandelmethodes in sterke mate leunt op empirisch onderzoek. [3] Het onderhavige projectvoorstel beoogt het empirisch TB-vaccinonderzoek te ondersteunen alsook fundamenteel onderzoek dat moet leiden tot een beter inzicht in TB-immuniteit, op basis waarvan nieuwe vaccins en vaccinatiestrategieën kunnen worden ontwikkeld.

Diverse manifesten onderschrijven de noodzaak van de inzet van extra middelen, inclusief het versterken van wetenschappelijk onderzoek, om de voortdurende globale tuberculose-epidemie effectief te kunnen bestrijden. In de *WHO End TB Strategy* worden 95% reductie in mortaliteit en 90% reductie in incidentie voor het jaar 2035 ten opzichte van 2015 ten doel gesteld. [4] De huidige trends, echter, geven op zijn minst aanleiding om te vrezen dat deze doelen niet gehaald zullen worden. Dat geldt evenzeer voor de duurzaamheidsdoelstellingen, de Sustainable Development Goals (SDG), van de Verenigde Naties (VN) ten aanzien van gezondheid en welzijn, en de maatregelen die nodig zijn om de TB-epidemie het hoofd te bieden. In zijn slotverklaring van de *High-Level Meeting (HLM) on TB* van 2018 stelde de VN dat alle mensen het recht hebben te profiteren van wetenschappelijke vooruitgang en de toepassing van wetenschappelijke bevindingen. [5] Dit bekrachtigt de visie dat meer onderzoek nodig is om verbeterde preventiemethodes te ontwikkelen om de curve van de globale TB-epidemie significant om te buigen.

Bacille Calmette-Guérin

Ten aanzien van preventie staat ons het van *Mycobacterium bovis*-afgeleide Bacille Calmette-Guérin - kortweg: BCG - ter beschikking. BCG is het enige geregistreerde TB-vaccin. [6] In vele nationale vaccinatieprogramma's worden kinderen met BCG gevaccineerd; wereldwijd meer dan 80% van alle pasgeborenen. BCG-vaccinatie beschermt met name kinderen maar blijkt niet of slecht werkzaam met name in adolescentie en volwassen populaties in de endemische gebieden. Tegelijkertijd vormt deze groep de voornaamste bron van verspreiding. Een beter vaccin of andere toedieningsstrategie die ook bij het vorderen van leeftijd bescherming biedt, is daarom dringend nodig om TB te voorkomen en de transmissie-cyclus te doorbreken.

Pathogeen-gastheer interactie

Er is een flink aantal vertegenwoordigers van het geslacht *Mycobacterium* met evenzovele gastheren onder de gewervelden dieren. Voor de mens is medisch gezien een aantal soorten dat behoort tot het zogeheten

Mycobacterium tuberculosis Complex (MTC) het meest relevant, omdat zij tuberculose kunnen veroorzaken. Binnen dit complex is de soort *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) de meest belangwekkende. [7]

Besmetting met *M. tuberculosis* vindt doorgaans plaats door inademing van een besmettelijk vloeistofdeeltje - een aerosol - afkomstig van een hoestend, niezend of pratend individu met zogeheten 'open TB'. Bij gevolg kan een ernstige bacteriële luchtweginfectie ontstaan, die - mits onbehandeld - in grofweg 50% van de gevallen dodelijk zal zijn. Maar, de longen zijn niet het enige orgaan dat kan worden aangetast. In een gedissemineerde infectie kan vrijwel ieder ander orgaan zijn aangedaan. Zo manifesteert *M. tuberculosis* met name in kinderen zich veelal als een gedissemineerde infectie in het centrale zenuwstelsel, met ernstige hersenvliesontsteking tot gevolg. In adolescenten en volwassenen, echter, is luchtweginfectie de meest voorkomende vorm, die bovendien - door bovengenoemde aerosol-verspreiding - de basis vormt voor de transmissie van TB.

Als eerder gesteld, is niet elke infectie met *M. tuberculosis* per se fataal. Desalniettemin ontwikkelt 5-10% van alle geïnfecteerde personen de ziekte tuberculose binnen een jaar, met wereldwijd als gevolg ongeveer tien miljoen nieuwe gevallen van tuberculose en anderhalf miljoen dodelijke slachtoffers per jaar.

M. tuberculosis bezit ruim 4000 genen in zijn erfelijke bagage en is daarmee uiterst flexibel om zich aan een veranderend (micro)milieu - lees: zijn gastheer - aan te passen. Bovendien bevat *M. tuberculosis* een kenmerkende, hoog-complexe celwand met biologisch actieve (glyco)lipiden die op tal van receptoren op menselijke cellen en die van het aangeboren afweersysteem in het bijzonder, aangrijpen. Aldus, is *M. tuberculosis* als geen ander organisme uitgerust om effectieve afweer door zijn gastheer te ontlopen.

Effectieve afweer & kenniskloven

M. tuberculosis is een facultatief intracellulair pathogeen. Hij infecteert primair myeloïde cellen zoals macrofagen, maar kan ook buiten de cellen van zijn gastheer overleven. Volgens de meest gangbare hypothese kan *M. tuberculosis* zich jarenlang in een sluimerende toestand schuilhouden (*dormancy*), alvorens te 'ontwaken' en ziekte te induceren. Als meest kenmerkende manifestatie van *M. tuberculosis* infectie geldt het zogeheten long-granuloom, een tuberkel of knobbeltje in het longweefsel waaraan de ziekte zijn naam ontleent. Zo'n granuloom is een georganiseerde structuur van (epitheloïde) macrofagen, al dan niet geïnfecteerd met *M. tuberculosis* en al dan niet gelegen rondom een necrotisch centrum van bacteriehoudend pus. Daaromheen bevinden zich diverse immuuncellen, zoals T en B lymfocyten van het adaptieve afweersysteem. TB-granulomen blijken dynamische structuren en vertonen een divers natuurlijk verloop, van resolutie van infectie tot progressieve necrotische en holte-vormende pathologie (cavitatie). Echter, hoe deze granuloom-geassocieerde processen worden gereguleerd en hoe die eventueel door vaccinatie kunnen worden beïnvloed, is voornamelijk onbekend. [8]

Door genetische knock-out studies in dieren en genetisch onderzoek naar natuurlijk voorkomende hypergevoeligheid voor tuberculose in de mens, is onomstotelijk vastgesteld dat cellulair-gemedieerde afweermechanismen die samenhangen met de cel-signaalstoffen interferon-gamma (IFN γ) en tumor necrosis factor-alpha (TNF α) kritisch noodzakelijk zijn voor effectieve afweer. [9] Echter, als voorspellende correlaten van afweer schieten deze immuunparameters tekort. [10, 11] Mede ook ons eigen recente onderzoek, dat onder de aflopende vergunning AVD.50200.2017.2645 is uitgevoerd, lijkt te wijzen op een kritische rol van interleukine-17, -10, en andere cytokines, en dan met name lokaal, in de luchtwegen. [12, 13] maar nader onderzoek zal nodig zijn om te bepalen welke signaalstof-patronen bij beschermende immuniteit horen. De rol van T cellen in effectieve TB afweer wordt niet bestreden, maar over de rol van bijvoorbeeld B lymfocyten en de door hen geproduceerde antistoffen, is er nog discussie. Ook in dat kader suggereert ons eigen recente werk dat antistoffen in de luchtwegen geassocieerd zijn met vaccin-geïnduceerde preventie tegen TB. [12, 14] Eenzelfde gebrek aan fundamenteel inzicht betreft de mogelijke rol van NK-cellen en zogeheten *innate lymphoid cells* (ILC). Er zijn steeds meer aanwijzingen over hun betrokkenheid bij TB-afweer en ook wij hebben recent kunnen vaststellen dat zij door TB-vaccinatie worden geactiveerd. [2, 15, 16]

Mede als gevolg van het fundamentele gebrek aan inzicht in beschermende immuniteit, is er de praktische tekortkoming dat in de kliniek de werking van nieuwe TB-vaccins niet door specifieke responsmetingen kan worden voorspeld. Als een dergelijk, eenduidig, voorspellend correlaat wel voorhanden zou zijn, zou dat het tijdrovende en kosten-verslindende traject van werkzaamheidsevaluatie - zogeheten fase 2B en fase 3 *clinical trials* - aanzienlijk bespoedigen. Op grond van de fylogenetische, pathogenetische en immunologische gelijkenis tussen mens en de in dit project te hanteren primaatmodellen (zie verderop), kunnen vaccinatie- en

gecontroleerde infectiestudies bijdragen aan de identificatie van correlaten, die uiteindelijk als biomerkers in klinische studies de ontwikkeling en evaluatie van verbeterde TB-vaccins zouden kunnen bespoedigen.

Van BCG, dat ondanks tekortkomingen velen en met name kinderen beschermt, is niet bekend hoe het precies werkt. BCG-vaccinatie induceert weliswaar specifieke cellulair-gemedieerde afweer op basis van verhoging van T-helper celfrequenties en IFNg- en TNFa-productie, maar ook hier blijken deze factoren onvoldoende te voorspellen of de vaccinatie bescherming biedt of niet. Recent onderzoek, waaronder ook ons eigen werk zoals hierboven al even aangehaald, werpt nieuw licht op de rol van lokale afweermechanismen en weefselspecifieke geheugenwerking van het immuunsysteem.

Uit epidemiologisch onderzoek blijkt dat BCG niet alleen een specifiek effect tegen TB sorteert, maar ook heterologe, *off-target* effecten heeft. Zo blijkt kindersterfte als gevolg van luchtweginfecties die niet zijn gerelateerd aan TB, te verminderen ná eerdere BCG-vaccinatie. Het mechanisme achter dit niet-specifieke, *off-target* effect lijkt te liggen in de metabole en epigenetische modificatie van monocytten en hun myeloïde voorlopers uit het beenmerg. Dit fenomeen noemen we *trained immunity* en valt als *immune memory* van het aangeboren afweersysteem te bestempelen (ofschoon het mechanistisch afwijkt van de welbekende geheugen-mechanismen van B en T lymfocyten). In ons eigen recente werk hebben we kunnen vaststellen dat die *trained immunity* ook in resusapen optreedt en dat de mate van *training* door de gekozen immunisatiestrategie kan worden beïnvloed. [17] Zowel in specifieke als in niet-specifieke afweer is het aannemelijk om te veronderstellen dat van monocytten afkomstige weefselmacrofagen (en wellicht ook andere celtypen van het aangeboren afweersysteem) zodanig door eerdere BCG-blootstelling worden gemoduleerd dat dit een gunstig effect op de lokale afweer heeft. Hoe dit precies in zijn werk gaat, is vooralsnog onopgehelderd en dient nader onderzocht te worden. Men kan veronderstellen dat een dieper inzicht in *trained immunity* en het effect op lokale immuniteit in de weefsels niet alleen relevant zal zijn voor verbeterde preventie tegen TB, maar ook in bredere zin voor een gunstig effect op heterologe luchtweginfecties, of wellicht zelfs ontstekingsziekten of vaccinatie-efficiëntie in het algemeen. [18]

Al met al is er nog een lange weg te gaan vooraleer we voldoende kennis hebben vergaard om daarmee versneld en rationeel verbeterde preventie- en behandelmethodes te ontwikkelen. Tot dan zijn empirische benaderingen onontbeerlijk. Het ontrafelen van mechanismen, het identificeren van correlaten en het dichten van kenniskloven vormen dus niet alleen fundamentele uitdagingen, maar bieden tegelijkertijd de kans om relevante kenniswaarde toe te voegen aan translationeel onderzoek naar nieuwe therapieën en verbeterde preventieve vaccinatie tegen TB. [2]

Nieuwe Vaccinatiestrategieën

Het wijdverspreide gebruik van BCG redt weliswaar vele kinderlevens per jaar, maar het voorkomt, als hierboven geschetst, niet de aanhoudende verspreiding, ziekte en sterfte ten gevolge van TB. Waarom BCG doorgaans zijn werking in adolescenten en volwassenen verliest, is niet duidelijk. Er is een associatie tussen afnemende BCG-werking en geografische breedtegraad, die op basis van epidemiologie en diemodelstudies wordt verondersteld te berusten op een blokkerend of maskerend effect van blootstelling aan niet-pathogene, niet-tuberculoïde mycobacteriën (NTM). [19] Deze NTM zouden dichter bij de evenaar - lees: in endemische gebieden - prevalenter zijn. Ofschoon immunologisch niet in overeenstemming met de regel dat herhaalde blootstelling de geheugenfunctie van afweer versterkt, wordt enig voordelig effect van BCG ogenschijnlijk tegengewerkt door eerdere mycobacteriële blootstelling. Kortom, een andere preventieve vaccinatiestrategie dan de huidige inenting met BCG, is dringend noodzakelijk voor een meest kosteneffectieve oplossing van de TB-epidemie.

Voor de ontwikkeling van verbeterde vaccins en vaccinatiestrategieën zijn simpelweg twee tactieken te onderscheiden. Enerzijds, het vervangen van BCG door een vaccin dat effectiever is. Anderzijds, het versterken van de afweer door een tweede of latere ronde vaccinatie ná een eerdere, primaire BCG-immunisatie (die doorgaans kort na de geboorte plaatsvindt). [20] Leunend op ons eerdere TB-vaccinonderzoek onder de aflopende vergunning AVD.50200.2017.2645 (als ook hierboven reeds aangehaald) beoogt het huidige projectvoorstel het creëren van het ethisch raamwerk om verder aan beide ontwikkelingsstrategieën te kunnen bijdragen.

BCG is ongeveer een eeuw geleden verkregen als verzwakte variant van *Mycobacterium bovis*. Tegenwoordig wordt door genetische manipulatie geprobeerd virulent *Mycobacterium tuberculosis* te attenueren. Anderen gebruiken gen-technieken om antigene determinanten aan *M. bovis* BCG toe te voegen, zodat het een breder

repertoire aan afweer kan opwekken. Ter verduidelijking: ten opzichte van *M. tuberculosis* mist *M. bovis* een aantal genetische regio's, *regions of deletion* of kortweg RD-regio's genaamd. Het geattenueerde *M. bovis* BCG mist daarnaast RD1 ten opzichte van zijn moederstam, waarmee het verzwakte fenotype verklaard is. [21] Wij hebben met onze proefdierstudies in het recente verleden aangetoond relevante signalen van bescherming en immuniteit door dergelijke levende, geattenueerde vaccins te kunnen onderzoeken. [10, 12, 13, 17] Door het in 2018 gepubliceerde, klinische werk van Nemes *et al* over re-vaccinatie met BCG, [22] is er hernieuwde aandacht voor de potentie van het (herhaald) toedienen van levend geattenueerd vaccin (i.c. BCG) op latere leeftijd. Op dat vlak hebben wij zeer recent bemoedigende resultaten gevonden met re-vaccinatie met BCG via alternatieve toedieningsroute (zie ook verderop), [16] hetgeen mede aanleiding vormt om dit projectvoorstel in te dienen. Daar waar we - in navolging van de voornoemde Nemes studie uit 2018 - re-vaccinatie jaren ná primaire, neonatale BCG-vaccinatie willen nabootsen, zullen we voor dit werk een cohort dieren ter beschikking hebben dat onder de projectvergunning AVD.50200.2020.9247 valt en vlak na geboorte intradermaal met een standaard humane dosis van BCG is gevaccineerd.

Naast attenuatie van mycobacteriën richten vaccinontwikkelaars zich vooral op zogeheten *subunit vaccines*. Hiermee wordt door toediening van slechts specifieke 'onderdelen' van *M. tuberculosis* geprobeerd de afweer tegen TB te versterken. Voor de inductie van effectieve afweer worden *subunits* als eiwit in een immuunstimulerende formulering (adjuvans) of in een virus-achtig of zogeheten nano-partikel verpakt, als DNA in een virale vector of plasmide gecodeerd, of als RNA in een gestabiliseerde vorm geïnjecteerd. Al deze methodes stellen ten doel de afweer die door BCG wordt geboden, te overtreffen. Voor de vaccinkandidaat M72, een fusie-eiwit geformuleerd in het AS01e adjuvans, is in 2018 een significant signaal van bescherming tegen ziekte uit een fase 2B studie gepubliceerd, hetgeen het mogelijke succes van deze benadering lijkt te onderschrijven. [23] Na eerdere studies, [11] is het onze intentie om ook onder het huidige raamwerk nieuwe *subunit vaccines* (in samenwerking met externe ontwikkelaars) pre-klinisch te onderzoeken.

Doelgroepen & eindpunten van TB-vaccinstudies

Vanuit een klinisch perspectief is het relevant om vaccinontwikkelingsstrategieën te verdelen naar de doelgroep waar ze op gericht zijn. Zo is er vaccinatie om infectie en daaruit voortvloeiende ziekte te voorkomen in hen die nog niet zijn blootgesteld of geïnfecteerd (*Prevention of Infection*, PoI). Anderzijds zijn er de methodes die streven progressie van ziekte in (latent) geïnfecteerden te voorkomen (*Prevention of Disease*, PoD). [3]

Wij hebben recent een voor het preklinische TB-onderzoeksveld nieuwe methode van infectieuze blootstelling gepioneerd. In plaats van een enkele dosis (*single low dose*; SLD) hebben wij herhaalde blootstelling aan een limiterende dosis van *M. tuberculosis* toegepast (*repeated limiting dose*; RLD). Deze RLD-blootstelling maakt dat niet direct alle niet-gevaccineerde controles ziek worden, maar levert een stochastisch proces op dat in de tijd kan worden gevolgd. [13] In overeenstemming met de werkhypothese, toonden we aan dat specifieke (i.c. mucosale) vaccinatie leidde tot vertraging van de ontwikkeling van TB aan de hand van een diagnostische IFN γ -productietest, een zogenaamde IGRA (IFN γ -release assay) zoals die ook in de kliniek wordt gehanteerd. Op basis van aanvullend en moleculair onderzoek (in samenwerking met collega's van de Harvard Medical School, MA, VS) hebben we onlangs moeten vaststellen dat de diagnostische IGRA-conversie weliswaar door de effectievere (mucosale) vaccinatie significant wordt vertraagd, maar dat dit desondanks niet als een preventie van infectie (PoI)- maar als een preventie van ziekte (PoD)-signaal moet worden geïnterpreteerd. [16] Hoe dan ook, uit bovenstaande valt op te maken, dat onze nieuw ontwikkelde infectiemethode met uitleesmogelijkheden van infectie zonder diagnostische conversie een relevante recapitulatie lijkt van klinisch relevante condities op basis van IGRA-status, die tot verder onderzoek noopt. *Nota bene*, ons projectvoorstel is gebaseerd op mogelijk gebruik van zowel SLD- alsook op de nieuw ontwikkelde RLD-infectie methode, afhankelijk van de specifieke doelstelling per proef.

Klinische evaluatie van werkzaamheid - Waarom dierproeven?

Van experimentele behandelmethodes moet wettelijk worden vastgesteld dat ze voor de betreffende doelgroep veilig en werkzaam zijn, alvorens ze in gebruik genomen mogen worden. Maar, aan het primair testen van nieuwe vaccins tegen TB in de mens, kleven een aantal aanzienlijke bezwaren. Zo is het bepalen van de attenuatiegraad van levende mycobacteriële vaccins in de mens onwenselijk, omdat eventueel noodzakelijke behandeling met antibiotica notoir inefficiënt is. Gevoelige diermodellen bieden uitkomst en

staan *a priori* toe om het risico van bijwerkingen te verminderen door vast te stellen of ziekteverwekkende eigenschappen tot een aanvaardbaar minimum zijn gereduceerd. En omdat eventueel noodzakelijke behandeling met antibiotica langdurig en niet zonder bijwerking is, is ook experimentele *M. tuberculosis* infectie in de mens voor de evaluatie van vaccin-werkzaamheid uitgesloten. Daarbovenop komt nog eens het feit - als hierboven toegelicht - dat we niet beschikken over het inzicht noch de éénduidige correlaten (bio-markers) die de beschermende werking van vaccinatie kort na toediening voorspellen. Wat aan mogelijkheden voor klinisch onderzoek resteert, zijn *trials* in grote cohorten waarin tuberculose infectie van nature voorkomt. Dergelijke klinische studies in *optima forma* - dat wil zeggen, gerandomiseerd, dubbel-blind, en placebo- en/of BCG-gecontroleerd - zijn in verband met relatief lage TB-incidenties en trage ziekteontwikkeling grootschalig, langdurig en kostbaar. En afgezien van de traagheid en complexiteit van het klinisch evaluatietraject, is er met name voor de ontwikkeling van de diverse TB vaccin-kandidaten eenvoudigweg onvoldoende klinische testcapaciteit (in de breedste zin van het woord) beschikbaar. Preklinisch onderzoek moet helpen alleen de meest veelbelovende kandidaten voor klinisch vervolgonderzoek te selecteren. Op grond van al deze factoren is evident dat studies in modellen een onmisbaar onderdeel vormen in het proces van ontwikkeling van betere vaccins tegen tuberculose.

Verscheidene TB-diermodellen

Diervrije modellen die de complexe interacties zowel binnen het immuunsysteem als tussen pathogeen en gastheer voldoende nabootsen, zijn er vooralsnog niet. Enkele onderzoekers proberen om veilige, gecontroleerde humane infectiemodellen te ontwikkelen, maar deze zijn nog in een prematuur stadium.^[24] Diermodellen, echter, zijn wel beschreven en beschikbaar. ^[25] Als vereenvoudigde weergave van de klinisch-biologische werkelijkheid, zijn ook diermodellen behept met tekortkomingen, maar ze beschikken over eigenschappen die als '*fit for purpose*' voor specifieke onderzoeks- en/of productontwikkelingsdoelstellingen bruikbaar zijn. Zonder een uitputtende beschrijving van alle voor- en nadelen te geven, benoemen we hier een aantal kenmerkende eigenschappen van de meest gangbare diersoorten in TB-onderzoek.

Vissen en runderen zijn van nature vatbaar voor de voor hen specifieke *Mycobacterium*-soort, maar minder of niet gevoelig voor *M. tuberculosis*. Zo worden runderen primair geïnfecteerd met *M. bovis* en via de orale route, en vertonen daarbij nadrukkelijk ook lymfatische pathologie. Experimentele luchtweginfectie, echter, is minder praktisch en *M. tuberculosis* weinig virulent. Dat geldt nog sterker voor vissen die typisch vatbaar zijn voor *M. marinum* en met name geschikt voor moleculair-celbiologisch onderzoek aan (vroege) tuberculoïde granuloom-manifestaties.

Van de knaagdieren als proefdier, vormen muizen ontegenzeggelijk de meest gebruikte soort. Zij omvatten goed-gekaracteriseerde inteeltstammen, lenen zich uitstekend voor onderzoek met behulp van genetische manipulaties (knock-out/knock-in), en er is een groot arsenaal aan (immunologische) onderzoeksreagentia beschikbaar om de gastheer-pathogeen interactie te bestuderen. Waar relatief hoge dosis-infectie met *M. tuberculosis* gebruikelijk is, toont recent onderzoek aan dat lage dosis-infectie de pathogenese en vaccin-effectiviteit kritisch kan beïnvloeden. Inmiddels zijn ook genetisch heterogene muismodellen beschreven, maar nog weinig gangbaar en beschikbaar. De correcte recapitulatie van pulmonaire tuberculoïde granuloomreacties in muizen staat voortdurend ter discussie. En ten aanzien van diverse elementen van afweer lijkt de genetische distantie en diversiteit tussen muis en mens te groot om deze soort als (enig) voorspellend model in productontwikkeling in te zetten.

In vergelijking tot muizen, zijn cavia's van oudsher in gebruik als zeer ziektegevoelig diermodel. Lage dosis-infectie met *M. tuberculosis* leidt tot acuut progressieve ziekte. Latentie wordt niet waargenomen. Daarnaast zijn voor diepgaand immunologisch onderzoek naar mechanismen en correlaten voor deze diersoort slechts weinig reagentia en assays beschikbaar. Konijnen daarentegen zijn weinig gangbaar, anders dan voor onderzoek naar humorale (niet cellulaire) TB immuniteit en specifieke aspecten van de TB-pathogenese, met 'cavitating disease' als een opmerkelijke mode-eigenschap.

Experimentele TB in niet-humane primaten

Van alle diersoorten worden niet-humane primaten (NHP) van bijzondere waarde voor tuberculoseonderzoek geacht op verscheidene gronden die even verderop worden toegelicht. Enkele marmoset-studies voor de bestudering van antibioticum-therapie uitgezonderd, worden in de literatuur met name makaken (*Macaca spp.*)

beschreven in de context van tuberculose- en vaccinontwikkelingsonderzoek. Het meest gerapporteerde diermodel is de resusaap, *Macaca mulatta*, gevolgd door de Java (of cynomolgus) makaak, *Macaca fascicularis*. Waar de onbehandelde resusaap na experimentele infectie doorgaans progressieve tuberculose vertoont, is - in zijn algemeenheid - de Java aap minder ziektegevoelig. Java apen vertonen ook onbehandeld latente infectie. Dit maakt dat beide species relevant zijn voor het bestuderen van verschillende facetten van humane TB of het onderzoeken van de werkzaamheid van nieuwe behandelingen.

De manifestaties van humane TB-infectie, de histologisch kenmerkende granuloomvorming in de long, disseminatie naar extrapulmonaire weefsels, latentie, specifieke immuunsuppressie (dan wel immunologische anergie) bij ernstige infectie, en tal van andere klinische verschijnselen als koorts, gewichtsverlies en (systemische) ontsteking, worden als zodanig ook bij makaken waargenomen na experimentele infectie met *M. tuberculosis*. [26] Geen enkele andere beschikbare diersoort vertoont zo'n grote gelijkenis met humane TB. Makaken zijn fylogenetisch nauw verwant aan de mens en vertonen uiteraard ook gelijkenis wat betreft anatomie, fysiologie en immuunsysteem. Mede met het oog op de gelijkende, complexe TB-pathogenese en immuniteit wordt in het TB-onderzoeksveld een grote voorspellende waarde aan NHP-modelstudies toegeschreven.

Gelijkend op wat in humane populaties wordt waargenomen, hebben we eerder aangetoond dat BCG-vaccinatie een variabel ziekte-beschermend effect heeft in makaaksoorten en tussen verschillende resus-cohorten. [10] Daarnaast, in de lijn van het eerdergenoemde verschil in ziektegevoeligheid hebben we ook preliminaire verschillen in gastheer-responsprofielen tussen resus- en Java apen beschreven. [27, 28] Naast de inductie van beschermde fenotypes door experimentele behandeling, bieden dergelijke contrasten in infectie- en vaccin-reacties tussen verschillende soorten en cohorten de mogelijkheid tot het bestuderen, identificeren en verifiëren van onderliggende mechanismen en correlaten in makaken, naast het toegepaste doel van therapieontwikkeling.

Tot slot, in de voorbije jaren en met name ook onder de aflopende projectvergunning, AVD.50200.2017.2645, hebben we een aantal dierstudies kunnen uitvoeren die hebben bijgedragen aan het ontwikkelingsproces van geattenueerde en subunit vaccins tegen TB, aan de vernieuwing, verrijking en verfijning van onze diergebonden onderzoekscondities, en een beter begrip van immuunafweer en experimentele infectie en ziekte in makaken. Onze ervaring en voortschrijdend inzicht leggen de basis voor de specifieke doelen en de strategie die we in het hiernavolgende uitwerken.

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.

Tuberculose-onderzoek in NHP als voorgesteld in dit project, dient de volgende directe doelen:

- Het toepassingsgericht ondersteunen van de ontwikkeling van nieuwe, verbeterde tuberculose-preventiemethodes door preklinische evaluatie van werkzaamheid en werking van nieuwe vaccins en alternatieve vaccinatiestrategieën.
- Het toepassingsgericht bestuderen en identificeren van correlaten en zogeheten bio-merkers in de primate, die als surrogaat kunnen dienen voor het vroegtijdig en verfijnd uitlezen van de werkzaamheid van vaccins, zowel in prekliniek als in de mens.
- Het fundamenteel bestuderen van mechanismen achter pathogenese en beschermende afweer door verdiepend onderzoek.
- Het verder ontwikkelen en verfijnen van NHP-modelcondities ter bevordering van bovengenoemde toepassingen.

Deze doelstellingen sluiten elkaar geenszins uit, maar zijn vaak complementair te benaderen. Ze kunnen en zullen - zover als studie- en projectcondities toestaan - nadrukkelijk worden gecombineerd ter bevordering van de vermindering van het gebruik van proefdieren.

Het bovenliggende, uiteindelijke doel van het project is een bijdrage te leveren aan het verlichten en terugdringen van de wereldwijde TB-epidemie, het reduceren van het sterftecijfer, en het verminderen van het medisch en sociaal-economisch lijden van mensen.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

Ons onderzoeksinstituut heeft de faciliteiten en expertise om de voorgenomen TB-studies in NHP uit te voeren. Wat betreft de faciliteiten is alle voor dit projectvoorstel voorziene infrastructuur, zowel voor huisvesting van en handelingen met dieren als voor diverse laboratorium-gebonden analyses met het van dieren afkomstige onderzoeksmateriaal, aanwezig en operationeel. Het instituut beschikt over de vergunning en de zelfvoorzienende fokkolonies waaruit geschikte dieren geselecteerd kunnen worden.

Een adequate staf van dierenartsen, -verzorgers en -trainers, alsook expertiseteams voor klinisch-chemische en hematologische bepalingen, microbiologische en pathologische analyses, en medische beeldvorming staan ter beschikking om gezondheid en welzijn van de dieren te bewaken en om specifieke waarnemingen die voor het onderzoek in dit infectieziektemodel relevant zijn, veilig te stellen. Er is een kader van doorlopende opleiding en training van personeel op de werkvloer. Ons instituut is sinds 2012 gecertificeerd door de *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)*.

Bovendien bestaat er binnen de Sectie TB Onderzoek & Immunologie van het instituut een jarenlange en internationaal onderkende expertise ten aanzien van het modelleren en bestuderen van experimentele tuberculose in NHP. Het huidige projectvoorstel behelst een voortzetting op basis van resultaten uit het afgelopen projectraamwerk onder AVD.50200.2017.2645 (waarvan de meest belangwekkende resultaten in de bovenliggende paragrafen zijn aangehaald). Specifieke immuunassays, apparatuur en protocollen zijn alle geïmplementeerd en worden continu doorontwikkeld en verfijnd. Deze onderzoeksgroep onderhoudt jarenlange samenwerkingen met diverse onderzoekers inclusief TB-vaccinontwikkelaars in de wereld. Vermeldenswaardig zijn de samenwerkingen binnen EU-gesponsorde netwerken die worden geleid door het *TuBerculosis Vaccine Initiative (TBVI, Lelystad)* en het *European Vaccine Initiative (EVI, Heidelberg)*, evenals binnen *Bill & Melinda Gates Foundation*-geïnitieerde netwerken onder de voormalige *AERAS Foundation* (nu ressorterend onder de *International AIDS Vaccine Initiative, IAVI*) en het huidige *Collaboration for TB Vaccine Discovery (CTVD)*.

Tot slot, door publieke presentaties, schriftelijke rapportage aan belanghebbenden, en publicaties na collegiale toetsing (*peer review*) in openbare tijdschriften, wordt voor een grootst mogelijke verspreiding van onze onderzoeksgegevens, kennis en inzichten gezorgd.

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?

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.

Als hierboven, onder 3.1 *Achtergrond*, uitgebreider beschreven, schieten zowel het enig beschikbare BCG-vaccin alsook de huidige therapeutische antibiotica-regimes tekort, waardoor tuberculose één van de meest bedreigende infectieziekten ter wereld blijft. Een gebrek aan kennis van beschermende immuniteit en complexe interacties tussen pathogeen en gastheer staan een rappe en volledig gerationaliseerde ontwikkeling van verbeterde preventie door middel van vaccinatie in de weg. De werking en werkzaamheid van nieuwe vaccins/vaccinatiestrategieën zal daarom proefondervindelijk, door middel van empirisch onderzoek, moeten worden vastgesteld. Omdat in het TB-onderzoeksveld de evaluatie en translatie van

nieuwe, experimentele behandelmethodes naar de kliniek sterk beperkt zijn door medisch-ethische belemmeringen inclusief regulerende wetgeving en capaciteitsgebrek (als onder 3.1 nader toegelicht), is het gebruik van modellen, en diermodellen in het bijzonder, voorsnog onontbeerlijk om uiteindelijk, via verbeterde preventieve vaccinatie, de voortdurende TB-epidemie het hoofd te kunnen bieden.

Primair zullen onze voorgestelde studies in NHP zich richten op het preklinisch evalueren van de werkzaamheid van nieuwe vaccinatiestrategieën tegen TB. Naast evaluatie van werkzaamheid (*efficacy*), zullen we ook willen en kunnen vaststellen of ze het veronderstelde werkingsmechanisme aan de dag leggen (*reactogenicity*, *immunogenicity*), en of ze goed en zonder ernstige bijwerkingen in de betreffende primaatsoort verdragen worden (*tolerability*).

Onze NHP-studiegegevens dragen met de hoogst mogelijke translationele betrouwbaarheid bij aan het vaststellen van de haalbaarheid van experimentele, preventieve behandelmethodes (*proof of concept*, PoC). Verder ondersteunen ze een eventueel preklinisch dossier van een productkandidaat (*stage gating*), en helpen ze bij het selecteren van alleen de meest veelbelovende kandidaten voor een nader klinisch evaluatieproces (*priority gating*). [29]

Ondanks verworven kennis van immuunreacties en pathogenese rondom TB, mist het onderzoeksveld een éénduidig begrip van mechanismen of correlaten van beschermende immuniteit die de ontwikkeling van verbeterde behandelingen remt. Omdat NHP TB in zoveel facetten humane TB zo dicht benadert, en met name omdat het immuunsysteem zo vergelijkbaar is en vele humane (immuun)reagentia kruisreageren, heeft dit project vooral ook de potentie om meer inzicht te verwerven in TB-specifieke immuniteit om productontwikkeling voor de mens te versterken en versnellen.

Uiteindelijk is het doel van onze inspanningen om in de meest brede zin bij te dragen aan de doelstellingen van de WHO *End TB Strategy*, de VN *Sustainable Development Goals*, en de slotverklaring van de VN *HLM On the Fight Against Tuberculosis 2018*, onderschreven door de Nederlandse overheid, om de wereldwijde last van tuberculose terug te dringen.

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

Belanghebbenden van het onderzoek zijn de direct samenwerkende collega's in betreffende tuberculose onderzoeks- en productontwikkelingsgebieden, in de voornoemde internationale organisaties en consortia waarin het TB-onderzoek is ingebed (zie onder 3.2.2), en alle onderzoekers die uit de te publiceren onderzoeksgegevens kunnen putten om nieuwe verbeterde preventie- en behandelmethodes tegen TB te ontwikkelen. Overkoepelende samenwerkingsverbanden als TBVI- of BMGF-netwerken hebben baat bij de onderzoeksresultaten die helpen bij het zogeheten portfoliomanagement van nieuwe kandidaten en strategieën, op basis van zogeheten *stage gating* en eventuele *priority gating* in het product- of biomerkerontwikkelingsproces. [29]

Uiteindelijk, in het langetermijnperspectief, zijn belanghebbenden van de voortgang van ons onderzoek uiteraard ook de mensen die door tuberculose getroffen worden. Dat betreft niet alleen het ziek-zijn en de mogelijk dodelijke afloop van infectie, maar ook de gezondheid ondermijnende gevolgen van behandeling, adversiteit van langdurig antibioticagebruik, het stigmatiserende karakter dat aan TB kleeft, en uiteraard de economische consequentie van verloren arbeidsproductiviteit door TB.

Ten aanzien van de proefdieren moeten we vaststellen dat hun integriteit per definitie door het voorgestelde onderzoek wordt aangetast. Met de grootst mogelijk zorg, echter, zullen we hun welzijn bewaken en alles in het werk stellen om pijn en ongerief zoveel mogelijk te voorkomen.

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 beslisriteria.

Algemene Opzet

De kern van de onderzoeksstrategie in dit project is toepassingsgericht op de evaluatie van werkzaamheid en werking van nieuwe vaccins en vaccinatiemethodes tegen TB. Daartoe zullen makaken onder experimenteel gecontroleerde omstandigheden aan de ziekteverwekker, *Mycobacterium tuberculosis*, worden blootgesteld. Blokkade van infectie, remming van mycobacteriële uitgroei, remming van conversie in TB-specifieke diagnostiek, en/of het voorkomen of reduceren van ziekte ten gevolge van infectie zijn daarbij de voornaamste uitkomstmaten voor de werkzaamheid van experimentele behandeling.

Fasering & Samenhang

Ter bestudering van vaccinkandidaten en nieuwe vaccinatiestrategieën zullen de dieren worden geïmmuniseerd om vervolgens een infectieuze blootstelling te ondergaan om vast te stellen of de preventieve behandeling ook werkzaam is geweest. Afhankelijk van de fase van ontwikkeling van een vaccinkandidaat, kan de nadruk in de vraagstelling op werking - lees: immunogeniteit - in plaats van werkzaamheid liggen. In zo'n geval kan het wenselijk zijn de dieren niet aan een infectie bloot te stellen, maar na vaccinatie op te offeren om relevant weefsel veilig te stellen voor nadere analyse. Mochten vervolgens de data daartoe aanleiding geven, kan een separaat vaccinatie-infectie-experiment worden voorgesteld om aanvullend ook de werkzaamheid (*efficacy*) te bepalen. Als alternatief kan ook een verkennende pilootstudie worden voorgesteld om een initiële puntschatter voor werkzaamheid of werking in NHP te verkrijgen van zowel een nieuw vaccin als een alternatieve vaccinatiestrategie.

Mede met het oog op de kenniskloven zoals die hiervoor, onder 3.1 *Achtergrond*, staan beschreven, en voor een optimaal gebruik van proefdieren, zullen tijdens elk experiment monsters worden verzameld om specifieke afweer tegen TB of pathogenese nader te bestuderen. Actuele immunologische en klinische analyses zullen prospectief in het studieplan (protocol) worden gedefinieerd. Resterend materiaal wordt opgeslagen om toekomstig retrospectief onderzoek mogelijk te maken, zodra het onderzoeksveld nieuwe assays of aanknopingspunten voor nadere analyses voortbrengt. Als eerder verduidelijkt, is dit onderzoek toepassingsgericht waar het de identificatie van correlaten en biomerkers van werkzaamheid betreft, en fundamenteel van aard om mechanismen van beschermende werking of pathogenese te ontrafelen.

We hanteren gestandaardiseerde protocollen voor de behandeling en infectie van makaken. Op grond van voortschrijdend inzicht, terugvertaling van klinische of experimenteel medische onderzoeksgegevens, of een specifieke vraagstelling, kan het nodig zijn om modelparameters te variëren en/of te optimaliseren. Waar nodig, zal een separate voorstudie worden gedaan om de verdere ontwikkeling en/of verfijning van onze NHP TB modellen te ondersteunen.

Mijlpalen en keuzemomenten

Wat betreft de evaluatie van nieuwe vaccinkandidaten is het gebruikelijk dat er al een 'dossier' van positieve resultaten over werking en/of werkzaamheid beschikbaar is, alvorens wordt besloten een NHP-studie te starten. Vaak zijn data uit kleinere gewervelde proefdiersoorten - muis en/of cavia - onderdeel van die voorkennis. Zodoende zullen alleen veelbelovende kandidaatvaccins voor een NHP-studie in aanmerking komen die in zulke eerdere studies een beschermend effect hebben laten zien. Wanneer geen ander model beschikbaar is dat het veronderstelde werkingsmechanisme recapituleert, kan het echter ook voorkomen dat wordt voorgesteld om een kandidaat direct aan een evaluatie in NHP te onderwerpen.

Ofschoon er niet een geschreven regel is, wordt in het TB-vaccin ontwikkelingsveld het relatief hoge risico op mislukking ondervangen en de inzet van langdurige, kostbare en beperkt beschikbare middelen voor klinische evaluatie onderbouwd door een zo sterk mogelijk preklinisch dossier, vaak met data over werkzaamheid in meer dan 1 diersoort. Het verzamelen van achtereenvolgens knaagdier- en NHP-data is geen ongebruikelijke strategie.

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

De noodzaak voor de ontwikkeling van betere vaccins/vaccinatiestrategieën volgt uit de hoge sterftcijfers, het aanzienlijk menselijk en economisch lijden ten gevolge van TB wereldwijd, en de tekortkomingen van het huidige BCG-vaccin. De noodzaak tot het empirisch vaststellen van de werkzaamheid van nieuwe

behandelmethodes in proefdieren, voorafgaand aan een klinisch productontwikkelingstraject, is in de voorafgaande paragrafen toegelicht. NHP, en makaken in het bijzonder, hebben in dit proces een grote translationele waarde vanwege hun fylogenetische verwantschap, fysiologische en immunologische gelijkheid, hun natuurlijke gevoeligheid voor *M. tuberculosis* infectie, en de grote overeenkomst in diverse pathologische manifestaties van tuberculose in de mens.

Ofschoon verscheidene *Mycobacterium*-soorten tuberculose kunnen veroorzaken, zijn onze NHP-modellen voor evaluatie van werkzaamheid gestandaardiseerd op het gebruik van hun voornaamste vertegenwoordiger, *Mycobacterium tuberculosis*. Zogeheten harmonisatie-stocks, gebaseerd op de virulente Erdman stam en veelal beschikbaar via het *Biodefense and Emerging Infections resources repository* in de VS, garanderen stringente testcondities voor nieuwe, preventieve behandelmethoden. Afhankelijk van vraag- en doelstelling, echter, kunnen ook andere stocks van *M. tuberculosis* worden gebruikt.

Zo biedt ook het gebruik van resusapen met hun hoge ziektegevoeligheid een relatief groot dynamisch bereik om een positief effect van (preventieve) behandeling te kunnen meten. Waar de vraagstelling daartoe aanleiding geeft, zijn Java apen beschikbaar om op een milder ziekteverloop te moduleren.

Werkzaamheid van nieuwe behandelmethoden wordt *a priori* afgelezen tegen onbehandelde controles. Nieuwe vaccins worden vaak bestudeerd in vergelijking ook tot de standaard, BCG, waarmee in de kliniek routinematig intradermaal wordt geïmmuniseerd. Voor het bestuderen van re-vaccinatie of booster vaccinatie met een groot tijdsinterval ten opzichte van de klinisch gebruikelijke primaire vaccinatie vlak na geboorte, zal een cohort van dergelijke neonataal BCG gevaccineerde dieren uit het project AVD.50200.2020.9247, ter beschikking komen.

Uit de aard van het TB-infectie- en ziektemodel en de genetische diversiteit in de uitteelt makaak populaties, is de spreiding in experimentele uitkomst zodanig dat met historische controles niet kan worden volstaan. Ons onderzoek in het verleden heeft expliciet aangetoond dat de uitkomst van intradermale BCG-vaccinatie, ondanks verregeerde standaardisatie, varieert per cohort. [10] Zonder enig bewijs voor causaliteit is het denkbaar dat deze variatie een niet-genetische grondslag heeft, maar een gevolg is van omgevingsfactoren. Door het gebruik van dieren uit onze zelfvoorzienende fokkolonies wordt deze variatie in omgevingsfactoren tot het minimaal mogelijke beperkt. Verder gebruiken we commercieel beschikbaar BCG (doorgaans stam Danish 1331) en volgens het voorschrift zoals het ook voor mensen wordt gebruikt. Variabele werkzaamheid beklijft overigens ook aan intradermale BCG-vaccinatie in diverse humane populaties, zoals ook in 3.1 *Achtergrond* toegelicht, en blijft vooralsnog een slecht begrepen fenomeen dat verder onderzoek verdient.

Wij hanteren weliswaar geen eigen productontwikkelingslijn voor nieuwe vaccins tegen TB, maar opereren op dit vlak al vele jaren in internationale (academische) samenwerkingsverbanden en ook één-op-één met professionele vaccinontwikkelaars om nieuwe methodes te onderzoeken. Hierdoor is ons werk ingebed voor de optimale translatie van onze onderzoeksresultaten richting klinische ontwikkeling en toepassing van verbeterde vaccinatiestrategieën. [20, 30]

Daarnaast onderzoeken wij proactief alternatieve toedieningsroutes van het reeds gelicenseerde BCG. Op eigen initiatief is aangetoond dat respiratoir-mucosale BCG-vaccinatie een significant betere bescherming biedt tegen herhaalde blootstelling aan een (limiterende) dosis *M. tuberculosis* dan de standaard intradermale immunisatieroute. [13] Hiermee is niet alleen een bemoedigend bewijs (een positieve controle) geleverd van het feit dat het model toestaat om een vaccineffect beter dan dat van intradermaal BCG aan te tonen. Het spoort ook aan om toekomstig onderzoek onder andere te richten op de verdere bestudering van alternatieve toediening van het bestaande BCG, mogelijk ook als effectieve revaccinatiestrategie na eerdere intradermale immunisatie. Voor het nabootsten van revaccinatie op langere termijn ná primaire vaccinatie met intradermaal BCG vlak na geboorte, zoals die in endemische gebieden gebruikelijk is, komen uit het projectvoorstel AVD.50200.2020.9247 neonataal gevaccineerde dieren ter beschikking.

Experimentele versus controle-vaccinatie en eventueel ook het gebruik van verschillende makaaksoorten zal contrasterende fenotypes opleveren in de vorm van dieren die wel of niet, of meer of minder effectief op behandeling reageerden. Daarmee bieden onze studies intrinsiek de kans om diepgaander mechanismen van bescherming en pathogenese te bestuderen. Longitudinale bemonstering stelt ons in staat om moleculaire en cellulaire responsprofielen te identificeren die als correlaat van werkzaamheid optreden. Met het laatstgenoemde hopen we uiteindelijk te kunnen bijdragen aan de definitie van bio-merkers die als surrogaat kunnen dienen voor het vroegtijdig en verfijnd uitlezen van de werkzaamheid van vaccins, zowel in mens als in prekliniek. Het te verwerven inzicht en de kennis van pathogenese en van beschermende afweer tegen TB

- wellicht *trained immunity* en/of *adaptive, tissue-resident memory* - zal uiteindelijk ten goede komen aan het hele TB-onderzoeksveld (en wellicht ook daarbuiten) om betere vaccinatie- en behandelstrategieën te ontwerpen.

Als hierboven benoemd, is er soms aanleiding om van gestandaardiseerde protocollen af te wijken en modelcondities aan voortschrijdend inzicht of specifieke doelstellingen aan te passen. Een specifieke studieopzet met relevante controles (maar zonder experimentele behandelmethodes *per se*) kan worden voorgesteld voor verdere ontwikkeling en/of verfijning van het diermodel. Daarbij valt bijvoorbeeld te denken aan het variëren van het inoculum door gebruik van pathogene stammen met een andere virulentiegraad, of het gebruik van gemarkeerd, traceerbaar *M. tuberculosis* voor nadere bestudering van de interactie van de pathogeen met zijn gastheer. (Onze laboratoria zijn toegerust om genetisch gemodificeerde varianten van *M. tuberculosis* - na vergunning door de betreffende autoriteit - te hanteren.) Het modelleren van TB of BCG-vaccinatie in de context van co-infectie (bijvoorbeeld HIV of (virale) luchtweginfectie) is een ander voorbeeld. De toediening van vaccins kan om variatie/optimalisatie van toedieningsmethode of tijdsintervallen vragen. Tot slot, bij het beschikbaar komen van nieuwe methodes en assays kan het wenselijk zijn om een andere meetopstelling of biosampling procedure te introduceren. Dergelijke innovaties dragen bij aan verdere optimalisatie en verfijning van ons onderzoeksmodel en beogen de translationele waarde van onze NHP-modelstudies en onze kennis van TB te vergroten.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Bestudering van werkzaamheid en/of werking van nieuwe vaccinatiestrategieën tegen tuberculose.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	