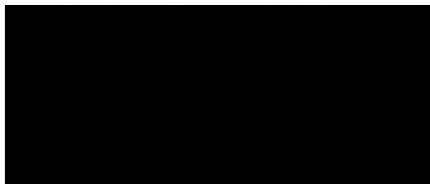




> Retouradres Postbus 93118 2509AC Den Haag



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
B.2.17.018

Uw referentie
[REDACTED]

Briefkenmerk
CCD-2018-134

Bijlage(n)
1

Datum 7 AUG 2018
Betreft Beslissing op bezwaar B.2.17.018 (W17-05)

Geachte heer [REDACTED]

Bij brief van 18 oktober 2017, ontvangen op 19 oktober 2017, heeft u, namens uw cliënte mevrouw [REDACTED] een bezwaarschrift (met kenmerk 2017/124) ingediend tegen het besluit van de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) van 27 september 2017 met kenmerk W17-05.

Verloop van de procedure

- Bij e-mail van 2 februari 2017 heeft uw cliënte met een beroep op de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) verzocht om de aanvragen voor projectvergunningen dierproeven die sinds 2014 zijn ingediend door de vergunninghouder BioXpert te Schaijk en om alle correspondentie, adviezen en besluiten over deze aanvragen;
- Bij besluit van 27 september 2017 is op dit Wob-verzoek beslist;
- Vervolgens ontvingen wij op 19 oktober 2017 uw bezwaarschrift, gericht tegen voornoemd besluit;
- De ontvangst van uw bezwaarschrift hebben wij per brief van 19 oktober 2017 bevestigd;
- Middels de brief van 18 december 2017 hebben wij de termijn om te beslissen op uw bezwaarschrift met zes weken verdaagd;
- Op 30 april 2018 is het Wob-besluit tezamen met de bijbehorende documenten op de website van de CCD geplaatst;
- Op 29 mei 2018 hebben wij u uitgenodigd voor een hoorzitting. Voorts hebben wij de hoorzitting per e-mail van 31 mei 2017 bevestigd;
- Bij e-mail van 7 juni 2018 zijn de geanonimiseerde zienswijzen van derde belanghebbenden aan u gestuurd. U bent daarbij in de gelegenheid gesteld om uw bezwaargronden eventueel aan te vullen.

- Op 19 juni 2018 heeft de hoorzitting met u plaatsgevonden. Het verslag van de hoorzitting treft u als bijlage aan bij dit besluit;
- De derde belanghebbenden hebben aangegeven niet gehoord te willen worden in deze zaak.

Beslissing

Het bestuur van de CCD verklaart het bezwaar namens uw cliënte gedeeltelijk gegrond en gedeeltelijk ongegrond. Dit betekent dat het besluit van 27 september 2017 gedeeltelijk wordt herroepen en gedeeltelijk blijft gehandhaafd. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen het bestuur van de CCD tot deze beslissing is gekomen.

Ten aanzien van de ontvankelijkheid

Het bezwaar richt zich tegen het besluit van 27 september 2017. Het bezwaarschrift is ingediend binnen zes weken na bekendmaking van het besluit. Het bezwaar is derhalve tijdig ingediend. Voldaan is ook aan de overige door de Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb) gestelde eisen, zodat het bezwaarschrift ontvankelijk is.

Derde belanghebbenden

Aan de derde belanghebbenden is gevraagd om gehoord te willen worden. De derde belanghebbenden hebben hier geen gebruik van gemaakt. De zienswijzen van de derde belanghebbenden uit de primaire fase, die door de vermelding van NTS-nummers verbonden zijn aan de verschillende documenten, zijn u voor de hoorzitting verstrekt.

Bezwaren

Hieronder worden uw bezwaargronden toegelicht.

Uw bezwaren zien toe op meerdere punten. Allereerst maakt u bezwaar tegen het besluit dat voor vijf vergunningen wordt verwezen naar documenten die eerder openbaar zijn gemaakt. U stelt dat door een nieuwe situatie, het faillissement van de vergunninghouder en het aflopen van de vergunningen, een nieuwe belangenafweging dient plaats te vinden voor deze vergunningen (**bezwaar 1**). Voorts maakt u bezwaar tegen het volledig weigeren van de adviezen aan de CCD op grond van artikel 11 van de Wob. Daarbij stelt u dat niet is terug te vinden welke aanvragen wanneer zijn behandeld (**bezwaar 2**). Daarnaast maakt u bezwaar tegen het feit dat in enkele documenten diersoorten, (sub)aantallen gebruikte proefdieren, aantallen groepen dieren en overlevingstijd op grond van artikel 10 lid 1 sub c van de Wob geweigerd wordt (**bezwaar 3**). Tevens maakt u bezwaar tegen het feit dat informatie wordt geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e van de Wob en dat dit wordt gemotiveerd door te verwijzen naar dierenrechtenactivisme. Bovendien hebben betrokkenen volgens u op geen enkele wijze inzichtelijk gemaakt dat zij in de afgelopen jaren zijn geconfronteerd met ontoelaatbare bejegeningen van (dierenrechten)activisten en voor zover de DEC te traceren is, dit door eigen toedoen is omdat zij de publiciteit heeft gezocht in haar werkzaamheden (**bezwaar 4**). Verder maakt u bezwaar tegen de weigering van de naam van de DEC, waarbij u stelt dat openbaarmaking van de naam van de DEC essentieel is om te kunnen controleren of het DEC-advies is uitgebracht door een erkende DEC (**bezwaar 5**). Tot slot wordt door u verzocht om



heroverweging van het besluit en om alsnog alle openbare informatie te verstrekken. Tevens wordt verzocht om toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb.

Ten aanzien van bezwaar 1

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond deels.

In de vijf vergunningen (NTS2015121, NTS2015124, NTS2015159, NTS2016412 en NTS2016413) is informatie geweigerd ter eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer en ter voorkoming van onevenredige benadeling. Geweigerd is de openbaarmaking van de namen van natuurlijke personen, directe telefoonnummers, directe e-mailadressen, functies van natuurlijke personen, handtekeningen en namen van (kleine) afdelingen. In onderliggende besluiten (W15-08, W15-11, W15-12 en W16-22S), die zijn genomen op eerdere Wob-verzoeken van uw cliënte, is onderbouwd waarom deze informatie is geweigerd.

De CCD heeft heroverwogen of bovenstaande informatie, gezien het faillissement van de vergunninghouder en het aflopen van vergunningen, alsnog geopenbaard kan worden. De CCD besluit om de informatie niet alsnog te openbaren.

Daartoe acht de CCD het volgende van belang. De betrokken natuurlijke personen oefenen een maatschappelijke taak uit en lopen het risico slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme. Hier dienen zij tegen beschermd te worden en te blijven, ook in het geval van een faillissement van een vergunninghouder of het aflopen van een vergunning. Deze omstandigheden maken niet dat de betrokkenen geen risico meer lopen om slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme. Zij zijn immers betrokken geweest bij dierproeven, hetgeen voor dierenrechtenactivisten voldoende aanleiding kan zijn voor bedreigingen. Verder is het zeer aannemelijk dat deze personen ook betrokken zijn bij andere nog lopende onderzoeken waarbij gewerkt wordt met proefdieren, dan wel bij andere proefdierinstellingen hun carrière hebben voortgezet, waardoor een dreiging blijft bestaan. De CCD blijft derhalve van oordeel dat het belang van de betrokken natuurlijke personen om beschermd te zijn tegen dierenrechtenactivisme zwaarder weegt dan het belang van openbaarheid en blijft zodoende bij haar besluit om voornoemde informatie niet te openbaren. Aanvullend wordt verwezen naar bezwaargrond 4 waar uitgebreid wordt ingegaan op de dreiging van dierenrechtenactivisme en de reden waarom bovenstaande informatie op grond van onevenredige benadeling geweigerd dient te blijven. Voor de volledige overweging, die onverminderd van kracht blijft, verwijst de CCD naar de onderliggende besluiten (W15-08, W15-11, W15-12 en W16-22S).

Bij de heroverweging is vastgesteld dat in NTS2015159 informatie is geweigerd die bij de andere vier vergunningen al is geopenbaard. Dit betreft de naam van de vergunninghouder, adresgegevens, KvK-nummer en het IBAN-rekeningnummer. Omdat verdere weigering van deze informatie om voornoemde reden geen doel treft, wordt bovenstaande informatie geopenbaard.

Ten aanzien van bezwaar 2

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond niet. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld, maar dit leidt niet tot verdergaande openbaarmaking.

Het advies aan de CCD is opgesteld ten behoeve van overleg en meningsvorming over een bestuurlijke aangelegenheid, zodat het is opgesteld ten behoeve van intern beraad. Het advies bevat meningen, voorstellen en inschattingen van de opsteller met betrekking tot een bestuurlijke aangelegenheid, en daarmee persoonlijke beleidsopvattingen. U geeft terecht aan dat het advies aan de CCD niet geheel uit beleidsopvattingen bestaat. Ook geeft u terecht aan dat passages in het advies, voor zover die zijn overgenomen in de besluitvorming en de vergunningen, geen persoonlijke beleidsopvattingen zijn. Zoals echter in het bestreden besluit is toegelicht is de feitelijke informatie die in het advies aan de CCD is opgenomen zozeer met de persoonlijke beleidsopvattingen verweven dat het niet mogelijk is om deze daarin te scheiden. Ter onderbouwing van deze argumentatie is verwezen naar twee uitspraken van de Afdeling¹. Aanvullend wordt ook verwezen naar de uitspraak van de Afdeling van 18 juli 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:2424).

Hoewel de verwevenheid van de beleidsopvattingen met feitelijke informatie belemmert dat het advies aan de CCD geopenbaard kan worden, staat het weigeren van dit document niet in de weg aan de daadwerkelijke openbaarmaking van de feitelijke informatie. De feitelijke informatie is immers afkomstig uit andere documenten (projectvoorstel, niet-technische samenvatting, de bijlagen beschrijving dierproeven en het DEC-advies). In deze documenten is de feitelijke informatie niet verweven met persoonlijke beleidsopvattingen. Door volledige of gedeeltelijke openbaarmaking van voornoemde documenten is de feitelijke informatie uit het advies aan de CCD reeds in andere vorm beschikbaar gesteld.

In uw bezwaarschrift geeft u verder aan dat niet is terug te vinden welke aanvragen wanneer zijn behandeld. Hierover bericht de CCD u als volgt. De verslagen van de CCD vergaderingen zijn terug te vinden op de website van de CCD, onder het tabblad over de CCD / vergaderverslagen. In de verslagen is opgenomen welke aanvragen (aangeduid met NTS nummers) zijn behandeld en wat de uitkomst van de beraadslaging van de CCD is. In het verslag staat kort opgenomen waar de aanvraag betrekking op heeft, of het DEC advies wel of niet wordt gevolgd en wat het besluit van de CCD is. Als een commissielid niet betrokken is bij de beraadslaging van de betreffende aanvraag staat dat eveneens aangegeven. Uit de vergaderstukken volgt dat de met het Wob verzoek opgevraagde documenten zijn besproken in de vergaderingen van 13 juli 2015, 8 augustus 2015, 9 oktober 2015, 30 oktober 2015, 20 november 2015, 11 december 2015, 19 februari 2016, 11 maart 2016, 1 april 2016 en 3 juni 2016.

Ten aanzien van bezwaar 3

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond niet. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld, maar dit leidt niet tot verdergaande openbaarmaking.

¹ Uitspraak van de Afdeling van 21 december 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3376) en de uitspraak van de Afdeling van 24 juni 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:1942)



In het bestreden besluit is gemotiveerd waarom de CCD in een aantal dossiers de diersoorten, de subaantallen dieren, aantallen groepen en overlevingstijd niet openbaart. Zo is onder andere gemotiveerd dat uit deze informatie de gevolgde lijn van de onderzoeker blijkt en dit essentieel kan zijn voor het verloop en de uitkomsten van het onderzoek. In aanvulling daarop bericht de CCD u dat de diersoorten, subaantallen dieren, aantallen groepen en overlevingstijd, zowel afzonderlijk als in onderlinge samenhang beschouwd, details betreffen die de onderzoeksopzet blootleggen. Deze informatie geeft inzicht in de afwegingen van de vergunninghouder op belangrijke beslispunten en in de wijze van totstandkoming van het productieproces. Dit maakt deze informatie in hoge mate concurrentiegevoelig, omdat concurrenten de informatie kunnen gebruiken voor een eigen onderzoeksstrategie in een vergelijkbare situatie, waarmee zij het onderzoek kunnen reproduceren. Voor het standpunt van de CCD dat gegevens over de onderzoeksopzet zijn aan te merken als bedrijfs- en fabricagegegevens vindt de CCD steun in de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015 (ECLI:NL:RBNNE:2015:4811).

In aanvulling hierop verwijst de CCD u naar de uitspraak van de rechtbank Breda van 20 juni 2011 (ECLI:NL:RBBRE:2011:BQ9223) en de uitspraak van de Afdeling van 4 november 2009 (ECLI:NL:RVS:2009:BK1977) waarin aantallen dieren zijn aangemerkt als bedrijfs- en fabricagegegevens.

Hoewel uw bezwaar hier niet op ziet blijft de CCD overigens ook bij haar besluit om bovengenoemde gegevens eveneens te weigeren ter voorkoming van onevenredige benadeling. Voor de onderbouwing van dit punt wordt verwezen naar het bestreden besluit.

Verder is de CCD in tegenstelling tot uw standpunt van mening dat bovenstaande bedrijfs- en fabricagegegevens nog actueel genoeg zijn om niet te openbaren. Vijf van de zes onderzoeken waarbij deze gegevens zijn geweigerd lopen nog. Eén onderzoek is inmiddels, nog geen jaar geleden, afgerond. Aannemelijk is dat nog beraadslaging plaats vindt of nog moet vinden over een eventueel vervolgonderzoek. Ook is aannemelijk dat de resultaten van het onderzoek nog niet naar buiten zijn gebracht door bijvoorbeeld publicatie in een wetenschappelijk tijdschrift. De details van de onderzoeksopzet (diersoorten, subaantallen dieren, aantallen groepen en overlevingstijd) worden om deze redenen nog niet geopenbaard. Overigens maakt ook het faillissement van de vergunninghouder niet dat deze details van de onderzoeksopzet kunnen worden geopenbaard. Het onderzoek is namelijk overgegaan naar andere vergunninghouders, die vergelijkbare belangen hebben als de inmiddels failliet verklaarde vergunninghouder.

Ten aanzien van bezwaar 4

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond niet. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld, maar dit leidt niet tot verdergaande openbaarmaking.

In uw bezwaar heeft u aangegeven dat de motivering van de Afdeling uitsluitend wordt gebaseerd op het feit dat onweersproken zou zijn gesteld dat betrokken vergunninghouders in de afgelopen jaren te maken hebben gehad met

bedreigingen en intimidatie en dat de dreiging van dierenrechtenactivisme nog actueel is, de opmerking over een mogelijke heropleving van dierenrechtenextremisme in een rapportage van de NCTV en dat dierenrechtenextremisme nog wordt genoemd in het jaarverslag van de AIVD. Daarnaast heeft u aangegeven dat de betrokken DEC de afgelopen jaren niet meer te maken heeft gehad met bedreigingen en intimidatie door dierenrechtenactivisten, dat de NCTV geen kennis heeft van recente acties van dierenrechtenextremisten en dat de AIVD kennelijk geen dreiging van dierenrechtenextremisme meer ziet.

Het bovenstaande is door u tevens aangevoerd in een hoger beroepsprocedure, welke uiteindelijk heeft geleid tot de uitspraak van de Raad van State op 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492). In deze uitspraak verwijst de Afdeling naar de recente uitspraken van 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), waarbij de Afdeling heeft overwogen dat de vrees voor dierenrechtenactivisme gerechtvaardigd is. De Afdeling ziet naar aanleiding van uw motivering geen aanleiding om thans tot een ander oordeel te komen. Het enkele feit dat in het jaarverslag van de AIVD over 2016 geen aparte signalering over dierenrechtenextremisme is opgenomen, is onvoldoende om thans tot een ander oordeel te komen dan in voormelde uitspraak.

Het voornoemde is nogmaals bevestigd in de zeer recente uitspraak van de Raad van State van 18 april 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:1282), waarbij aanvullend is aangegeven dat derde belanghebbenden geen concrete tot hen gerichte dreiging van dierenrechtenactivisme aannemelijk hoeven te maken. Ook uit de uitspraken van de rechtbank Gelderland van 5 april 2018 (ECLI:NL:GBGEL:2018:1532) en van de rechtbank Den Haag van 20 februari 2018 (ECLI:NL:RBDHA:2018:1766) volgt, dat vanwege de gerechtvaardigde vrees voor dreiging van dierenrechtenactivisme, het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

Uw standpunt dat de naam van de betrokken DEC niet kan worden geweigerd omdat zij in het verleden zelf de publiciteit zou hebben gezocht kan overigens ook geen stand houden. Van belang is hierbij de context van de gevraagde documenten in relatie tot de naam van de DEC. Juist het openbaar maken van de naam van de DEC in combinatie met een specifiek onderzoek waarover deze DEC adviseert, brengt een ongeoorloofd risico op dierenrechtenactivisme met zich mee. Om die reden blijft de CCD van oordeel dat de naam van de DEC niet kan worden geopenbaard. Het feit dat de DEC in het verleden, in algemene zin los van een specifiek onderzoek, ooit in de publiciteit genoemd is maakt dit niet anders.

Ten aanzien van bezwaar 5

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond niet.

Slechts door de CCD erkende DEC's zijn bevoegd de CCD van advies te voorzien (artikel 18a Wod). De betrokken DEC is door de CCD erkend. Dit volgt onder meer uit een brief van 22 december 2015 van de CCD aan de Staatssecretaris van het toenmalige Ministerie van Economische Zaken, welke bij u bekend is. Bovendien



heeft op 9 februari 2016 publicatie in de Staatscourant plaatsgevonden (Staatscourant 2016 nr. 5940), zodat is voldaan aan het vereiste uit artikel 18b, tweede lid, van de Wod.

Aangezien de CCD voor de vergunningen aan de betrokken DEC opdracht heeft gegeven een advies uit te brengen, in combinatie met hetgeen hiervoor is aangegeven, bestaat er voor u geen reden te twijfelen aan de erkenning van de betrokken DEC. Mocht deze twijfel wel bestaan, dan staat het weigeren van de naam van deze DEC hier niet aan in de weg. Ter onderbouwing hiervan wordt verwezen naar de recente uitspraken van uw Afdeling van 18 april 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:1282), 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492), 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680) en de uitspraken van de rechtbank Gelderland van 5 april 2018 (ECLI:NL:RBGEL:2018:1532) en van de rechtbank Den Haag van 20 februari 2018 (ECLI:NL:RBDHA:2018:1766).

Verzoek proceskostenvergoeding

U heeft verzocht om proceskostenvergoeding door toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb. Ingevolge artikel 7:15 lid 2 Awb komen de kosten die de belanghebbende in verband met de behandeling van het gemaakte bezwaar heeft moeten maken voor vergoeding in aanmerking, indien sprake is van een herroeping van het besluit, vanwege een aan het bestuursorgaan te wijten onrechtmatigheid. Gelet op artikel 7:15 lid 2 Awb in samenhang met het Besluit proceskosten bestuursrecht heeft u recht op een vergoeding van € 1.002,- zijnde 1 punt á € 501,- voor het ingediende bezwaarschrift en 1 punt á € 501,- voor de gehouden hoorzitting.

Wijze van openbaarmaking

Aangezien de mogelijkheid bestaat dat belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten niet eerder plaats, dan vier weken na dagtekening van deze beschikking, conform artikel 6, vijfde lid, van de Wob. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking tegen te houden.

Dit kan door het indienen van een beroepschrift bij de rechtbank én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om, bij wijze van voorlopige voorziening, het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. Indien binnen twee weken na dagtekening van dit besluit een verzoek om voorlopige voorziening is gedaan bij de rechtbank, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

Beroep

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief een beroepschrift indienen. Stuur het beroepschrift naar de rechtbank in uw arrondissement. Voor meer informatie verwijst ik u naar www.rechtspraak.nl.

U kunt ook digitaal beroep instellen bij genoemde rechtbank via <http://loket.rechtspraak.nl/bestuursrecht>. Daarvoor dient u wel te beschikken


over een elektronische handtekening (DigiD). Kijk op de genoemde site voor de precieze voorwaarden.

Tot slot

In deze brief is u uitgelegd wat de reden is voor deze beslissing. Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl of neem telefonisch contact met ons op via 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Hoogachtend,


De Centrale Commissie Dierproeven,


dr. L. Hellebrekers
Voorzitter

Inventaris Wob-verzoek W17-05										
nr.	document NTS nr 2015142	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS Initieel			x						
3	Projectvoorstel				x	x		x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x	x		x		
5	DEC advies				x		x	x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
8	NTS aangepast	x								
9	Adviesnota CCD		x							x
10	Beschikking				x		x	x		
11	mail aan DEC over beschikking				x		x	x		
12	Bezwaarschrift				x		x	x		
13	Herziene beschikking				x		x	x		

1.



08 OKT. 2015

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 90500 / 1142
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	BioXpert BV
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	54838134

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

Straat en huisnummer	Nistelrooise Baan	3
Postbus		
Postcode en plaats	5374RE	Schaijk
IBAN	NL72RABO0183605888	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	Viroclinics Biosciences B.V.	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	Viroclinics Biosciences B.V.	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|--------------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [REDACTED] | |
| Afdeling | Scientific support | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het Ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag |
| <input checked="" type="checkbox"/> Nee |

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- | |
|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 |
| <input type="checkbox"/> Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3 |
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier |
| <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6 |

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 9 - 2015 |
| Einddatum | 31 - 8 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|---|
| Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten. |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|---|
| Het testen van de werkzaamheid van influenza vaccins al dan in combinatie met een adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten. |
|---|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------|
| Naam DEC | [REDACTED] |
| Postadres | [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[REDACTED]
Functie	vergunninghouder
Plaats	Schaijk
Datum	10 - 6 - 2015
Handtekening	[REDACTED]



BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3

5374 RE Schaijk

The Netherlands

T: +31 (0) 486-463303

F: +31 (0) 486-463498

info@bioxpert.nl

www.bioxpert.nl

Aan: Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Datum: 25 september 2015

Betreft: Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD905002015142

Geachte heer / mevrouw,

Bijgaand de getekende aanvraag Projectvergunning Dierproeven AVD905002015142 met als titel:

Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten.

Deze aanvraag is vandaag met de beveiligde e-mailverbinding ingediend.

Met vriendelijke groet,





2.

Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Het testen van de werkzaamheid van influenza vaccins al dan in combinatie met een adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Influenza virus, vaccinatie, werkzaamheid

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>In de experimenten van dit project zullen verschillende vaccinatiestrategieën uitgetest gaan worden tegen infectie met verschillende influenzavirussen. Jaarlijks circulerende seizoensinflenzavirussen kunnen in gezonde personen een milde ziekte veroorzaken, maar ernstige ziekte kan het gevolg zijn wanneer er sprake is van infectie met de zogenaamde "pandemische" virussen (zoals bv. de Spaanse Griep, de Mexicaanse griep). Deze "pandemische" virussen zijn virussen die relatief nieuw zijn in de mens en waartegen geen bescherming is door vaccinatie of eerdere infectie. Daarnaast kunnen mensen met een onderliggende ziekte (bijvoorbeeld longpatiënten) ook vatbaarder zijn voor een ernstig ziektebeeld bij infectie met een relatief mild seizoensinflenzavirus.</p> <p>Vaccinproducenten zijn contant bezig met het ontwikkelen van vaccins</p>
---	--

tegen seizoensvirussen, maar daarnaast is het ontwikkelen van een vaccin tegen "pandemische" virussen erg belangrijk. Beide virusvarianten veroorzaken elk jaar een grote ziektelast en een aanzienlijke sterfte en hebben grote economische gevolgen.

In alle experimenten zal gekeken worden naar de afweer welke opgewekt wordt door vaccinatie met nieuwe vaccins tegen of seizoensinfluenzavirussen of "pandemische" influenzavirussen, onder andere met als doel of deze resultaten ook een aanwijzing kunnen zijn voor de werkzaamheid van het vaccin. Daarnaast zullen de dieren vervolgens geïnfecteerd worden en onderzocht of de vaccins bescherming bieden tegen infectie en/of tegen het ontwikkelen van klinische verschijnselen na infectie.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

De resultaten verkregen in deze studie zullen bijdragen aan de kennis over de veiligheid en werkzaamheid van de uit te testen vaccins. Resultaten zullen tevens gebruikt kunnen worden voor de registratie van vaccins voor toekomstig geneeskundig gebruik.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Diersoort: fretten
Geschat aantal: 600

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Door de infectie met influenzavirus kunnen de dieren in meer of mindere mate last krijgen van een longontsteking afhankelijk van de werkzaamheid van het vaccin en de keuze van het virus. In het algemeen zullen de klinische verschijnselen bij infectie met seizoensvirussen minder ongemak (matig) veroorzaken dan infectie met "pandemische" virussen (ernstig).

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Na infectie met seizoensvirussen is het maximale ongemak ingeschaald als matig, na infectie met "pandemische" virussen als ernstig.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Overlevende dieren zullen na afloop van de studie gedood worden om in verschillende weefsels te bepalen hoeveel virus erin zit of te bestuderen of de dieren beschermd zijn tegen het ontstaan van schade.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

De studies welke uitgevoerd worden onder dit project zijn opgezet om de werkzaamheid van vaccins te bestuderen tegen infectie met influenza virus. Dergelijke studies zijn niet mogelijk zonder diermodellen met een intact afweersysteem.

4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal

In het verleden zijn al meerdere studies uitgevoerd om de werkzaamheid van influenzavaccins te testen. Meerdere van deze studies zijn gepubliceerd in gerenommeerde tijdschriften en hebben laten zien dat de hier voorgestelde groepsgrootte geschikt is om een uitspraak te doen over de validiteit van de studies. Daarnaast zullen deze ervaringen ook gebruikt

dieren wordt gebruikt.

worden om een zo optimaal mogelijk opzet te definiëren om te komen tot een bruikbaar eindresultaat.

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Fretten zijn het kleinste mogelijke proefdiermodel voor influenzastudies aangezien fretten, in tegenstelling tot bijvoorbeeld muizen, wel geïnfecteerd kunnen worden met klinische relevante circulerende virussen. Ook lijkt het ziektebeeld na infectie in fretten op dat van de mens.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De dieren worden standaard gehuisvest in groepen met kooiverrijking en minimaal eenmaal per dag gecontroleerd. De meest ingrijpende handelingen zullen uitgevoerd worden onder verdoving. Als de dieren een bepaalde ziektebeeld gaan vertonen (luchtwegproblemen) zullen de dieren intensiever geobserveerd worden.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



3.

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
- 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.

In het kader van vaccin en antiviralen ontwikkeling tegen influenza biedt de aanvrager van dit

projectvoorstel verschillende preklinische modellen aan om deze preparaten uit te testen. Deze preparaten worden verschaft door derden (in het algemeen farmaceutische bedrijven) en maken gebruik van de expertise bij de aanvrager voor het bepalen van het relevante in vivo model om het preparaat uit te testen.

Vaccinproducenten zijn contant bezig met het ontwikkelen van vaccins tegen seizoensvirussen, maar daarnaast is het ontwikkelen van een vaccin tegen "pandemische" virussen ook erg belangrijk. Vanwege de genetische veranderlijkheid van influenzavirussen an sich is het zaak om de zgn. seizoensvaccins indien nodig aan te passen aan de op dat moment circulerende virussen. Deze constante verandering van het seizoensinfluenza virus, waardoor het seizoensvaccin slechter of niet werkt, wordt genetische drift genoemd. Seizoensinfluenza treft jaarlijks tussen de 5% en 10% van de volwassenen en zo'n 20% tot 30% van de kinderen. De ontwikkeling van griep kan resulteren in hospitalisatie en sterfte in vooral de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden en chronisch zieken). Geschat wordt dat de jaarlijkse epidemieën wereldwijd 3 tot 5 miljoen ernstig zieken leidt en tussen de 250.000 en 500.000 sterftegevallen. In ontwikkelde landen vallen de meeste doden bij mensen ouder dan 65 jaar. Epidemieën kunnen tevens leiden tot absentie van arbeiders en scholieren en daarmee economische schade veroorzaken (WHO Influenza fact sheet, 2014).

Influenza pandemieën (uitbraken die grote delen van de wereld bestrijken vanwege de introductie van een nieuw influenzavirus dat niet eerder in mensen waargenomen is, zoals bv. de Spaanse (1918), Aziatische (1957) en Hongkong (1968) griepandemieën in de vorige eeuw) zijn onvoorspelbare maar terugkerende gebeurtenissen die wereldwijd grote gezondheids-, economische en maatschappelijke gevolgen hebben. Deze influenza pandemieën ontstaan doordat het betreffende virus overspringt van het normale reservoir (vaak watervogels, waardoor deze virussen in het algemeen aangemerkt worden als vogelgriepvirus) naar de mens (een proces dat genetische shift wordt genoemd), waarbij de ziekteverschijnselen in het reservoir relatief mild zijn, maar in de mens ernstig kunnen zijn. Hiervoor zijn meerdere parallelle factoren betrokken: een vogelgriepvirus dat in staat is om blijvende mens-op-mens transmissie te bewerkstelligen waarbij het een virus betreft waarvoor geen of nauwelijks immuniteit tegen is opgebouwd in de populatie. Door de wereldwijde toename in handel en reismogelijkheden kan een lokale epidemie snel omslaan naar een infectie op pandemische schaal waarbij weinig tijd beschikbaar is om accurate maatregelen te nemen vanuit het oogpunt van de volksgezondheid. Recentelijk zijn vogelgriepvirussen A(H5N1) en A(H7N9) geïdentificeerd als zijnde virussen die potentieel een pandemie zouden kunnen veroorzaken, omdat ze blijven circuleren in pluimvee, de meeste mensen geen immuniteit tegen deze stammen hebben en zo dus ernstige ziekte en sterfte kunnen veroorzaken. Daarnaast kan niet uitgesloten worden dat influenzavirussen uit andere bronnen zoals bv. varkens, ook pandemisch potentieel hebben (WHO Avian Influenza fact sheet, 2014).

Wereldwijde surveillance en monitoringsprogramma's zijn dan ook van groot belang om zo goed mogelijk voorbereid te blijven op mogelijke pandemische uitbraken, hiertoe werkt de WHO op verschillende platforms samen met de wereldorganisatie voor animal health (OIE) en de voedsel en agricultuur organisatie (FAO). Het Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) houdt de evolutie (de zogenaamde genetische drift en -shift) in de gaten en adviseert jaarlijks wat de samenstelling van de seizoensinfluenzavaccins zou moeten zijn voor zowel het noordelijke als het zuidelijke halfrond. Indien als voorbeeld wordt gekeken naar de samenstelling van het seizoensvaccin sinds 2009 zijn een aantal opmerkelijke fenomenen te zien:

- In 2009 was de uitbraak van Mexicaanse griep: dit was gekenmerkt als een pandemie omdat het virus uit de varkenspopulatie was overgesprongen naar de mens (genetische shift). Sindsdien heeft deze Mexicaanse griep, welke van het H1N1 fenotype is, het voorgaande H1N1 verdrongen en is tot op heden onderdeel van het seizoensvaccin (2010 tot heden). Echter in de afgelopen jaren is er geen bijstelling geweest van de H1N1 component van het vaccin, wat aantoont dat de genetische drift van dit H1N1 influenza virus beperkt is.
- Een ander onderdeel van het seizoensvaccin is het H3N2 influenza virus en dit virus heeft sinds 2009 wel een genetische drift laten zien, waarbij deze component van het vaccin in de overgang van 2012 naar 2013, van 2014 naar 2015 en 2015 naar 2016 aangepast is.

In het kader van vaccinatie tegen seizoensvirussen zijn de afgelopen jaren meerdere ontwikkelingen geweest. Tot op heden wordt het overgrote deel van de mensen gevaccineerd met een relatief kaal seizoensvaccin waarin de drie meest voorkomende influenza virussen vertegenwoordigd zijn. Deze vaccins hebben geen hulpstoffen om ze efficiënter te laten werken. Het nadeel van deze strategie is dat het alleen werkt in personen die al jaren deze vaccinatie ontvangen en dus een zogenaamd geheugen hebben opgebouwd en veel minder in personen (bijvoorbeeld jonge kinderen) die dit geheugen nog niet hebben. Verder bestaat er naast het eerdergenoemde jaarlijkse samenstellingsadvies vanuit de WHO de aanbeveling om het huidige vaccin uit te breiden naar vier in plaats van drie componenten om de effectiviteit te verbreden (WHO 2015). Daarnaast zijn verschillende vaccin producenten bezig met het ontwikkelen van een levend verzwakt vaccin. Dit vaccin induceert een zeer kortdurende niet-ziekmaakende infectie en dit leidt in het algemeen tot een betere afweer ook in personen zonder het bovengenoemde geheugen [REDACTED]

In het kader van zowel seizoens- als zgn. pandemische virussen richt het vaccinonderzoek zich vooral op het creëren van een universeel vaccin welke werkt tegen verschillende influenza virussen. De meest gevolgde vaccinconcepten hierbij zijn het gebruik van preparaten die gericht zijn op geconserveerde (minder veranderlijke) delen van het influenzavirus, dan wel gebruik van eerdergenoemde levende verzwakte vaccins die op grond van hun replicatie-eigenschappen in staat zijn om bredere immuniteit op te wekken dan de traditionele geïnactiveerde vaccins (Jang & Seong, *Viruses*, 2014). Een dergelijke aanpak zorgt ervoor dat in het geval van een uitbraak er snel gereageerd kan worden of dat de mens op voorhand beschermd kan worden door vaccinatie. Daarnaast wordt er ook onderzoek gedaan naar specifieke vaccins, bijvoorbeeld tegen virussen die al langer in omloop zijn, maar nog geen pandemie hebben veroorzaakt (Pascua, *Clin Exp Vaccine Res*, 2014). Tenslotte wordt er ook onderzocht of bijvoorbeeld toevoegingen (in de vorm van zgn. adjuvantia) aan het huidige seizoens-influenza vaccin dit vaccin potenter kunnen maken en zo ook bescherm kan bieden tegen infectie met "pandemische" influenza virussen (Del Giudice & Rappuoli, *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2015).

In de experimenten beschreven in het huidige project zal zowel gekeken worden naar de afweer welke opgewekt wordt door vaccinatie, onder andere met als doel of deze resultaten ook een aanwijzing kunnen zijn voor de werkzaamheid van het vaccin. Daarnaast zullen de dieren vervolgens geïnfecteerd worden en onderzocht of ze beschermd zijn tegen infectie en/of tegen het ontwikkelen van klinische verschijnselen na infectie.

In de afzonderlijke studies welke onder dit project zullen vallen, zullen influenza vaccins gebruikt gaan worden, waarvan de effectiviteit uitgetest zal worden tegen challenge met laag pathogeen seizoen dan wel hoog pathogeen pandemisch influenza virus. Voor zowel vaccin productie tegen seizoens-influenza als "pandemic preparedness" doeleinden (het klaar staan in het geval van een mogelijk nieuwe influenza pandemie) is het van belang dat (zo vroeg mogelijk) een kandidaat vaccin uitgetest wordt in het influenza fretten model. De opzet van de studies welke vallen onder dit project zijn gebaseerd op ervaringen opgedaan in eerdere dierstudies.

In het kader van laag pathogeen seizoens-influenza is een studie uitgevoerd (niet publiekelijk beschikbaar), in deze studie waren dieren gevaccineerd op studiedag 0 met, in dit geval levend geattenuerd verzwakt, trivalent influenza vaccin en vier weken later waren de dieren geïnfecteerd met elk van de drie seizoens-influenza virussen welke ook gerepresenteerd waren in het vaccin. In dit geval waren de dieren slechts eenmalig gevaccineerd aangezien serologie in een eerdere studie (eigen onderzoek: [REDACTED] had aangetoond dat een eenmalige vaccinatie met een levend verzwakt vaccin voldoende hoge antistof titers induceert en dit werd ook bevestigd in de bovengenoemde studie. Daarnaast zijn dieren in een andere studie ook gevaccineerd tegen seizoensinfluenza met een geadjuveerd geïnactiveerd trivalent vaccin, waarna de dieren geïnfecteerd werden met het Mexicaanse griepvirus, dat op dat moment een pandemisch influenza virus was, maar dat ondertussen behoort tot het seizoensinfluenzavirus. De resultaten van deze studie zijn beschreven (eigen onderzoek: Del Giudice, *Science TM*, 2009) en resultaten lieten zien dat twee keer vaccineren met een drieweeks interval leidde tot bescherming tegen infectie vier weken na de tweede vaccinatie.

In het kader van pandemische influenza virussen zijn meerdere studies uitgevoerd met al dan niet geadjuveerd geïnactiveerd antigeen en een aantal van deze studies zijn ook gepubliceerd (eigen onderzoek: o.a. [REDACTED]

██████████ Het vaccinatie schema in al deze studies komt overeen met het vaccinatie schema dat voorgesteld wordt in dit projectvoorstel, namelijk vaccinatie op dag 0 en dag 21 en vier weken na de laatste vaccinatie challenge.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het primaire uitleesparameter van de afzonderlijke experimenten in het project is de effectiviteit van vaccinatie tegen challenge met het betreffende (homoloog) of een afwijkend (heteroloog) influenza virus?

Deze doelstelling wordt geadresseerd door te bepalen in welke mate vaccinatie resulteert in bescherming tegen infectie, op basis van uitleesparameters als virus concentraties in respiratoire monsters, pathologische en klinische verschijnselen en overleving.

Daarnaast zullen de resultaten van de individuele experimenten ook gebruikt worden om te bepalen of het mogelijk is om zogenaamde "correlates of protection" te definiëren. Hiervoor zal in bloedmonsters bepaald worden of een bepaalde mate van immunogeniciteit (ofwel humoraal ofwel cellulair) gecorreleerd is met bescherming tegen challenge.

Dit soort effectiviteitsstudies worden door de farmaceutische bedrijven uitbesteed bij de aanvrager vanwege de hoge expertise op het gebied van influenza en haar relevante in vivo modellen. Deze expertise leidt tot een toename van de kwaliteit van het ontwikkeltraject van het betreffende vaccin. Verschillende studies zijn ook beschikbaar in het publieke domein in de vorm van publicaties (zie hierboven bij 3.1), wat de hoge mate van kwaliteit van dergelijke studies aantoont. Tevens hebben meerdere studies ook daadwerkelijk geleid tot vrijgave van bepaalde vaccins: een belangrijk voorbeeld is het vaccin van ████████ tegen hoog pathogeen H5N1 influenza virus (ook vogelgriep genoemd). Dit vaccin is uitgetest volgens de "animal rule" van de FDA in fretten bij de aanvrager en resultaten verkregen in o.a. deze studie hebben geleid tot vrijgave van het vaccin voor humaan gebruik. Vanwege ethische bezwaren is het niet mogelijk om het effectiviteit van dergelijk vaccins tegen ernstig ziekmakende influenza virussen in mensen te testen (het zogenaamde humane challenge model).

3.3 Belang

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

Maatschappelijk belang:

Seizoensinfluenza treft jaarlijks tussen de 5% en 10% van de volwassenen en zo'n 20% tot 30% van de kinderen. De ontwikkeling van griep kan resulteren in hospitalisatie en sterfte in vooral de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden en chronisch zieken). Geschat wordt dat de jaarlijkse epidemieën wereldwijd 3 tot 5 miljoen ernstig zieken leidt en tussen de 250.000 en 500.000 sterftegevallen. In ontwikkelde landen vallen de meeste doden bij mensen ouder dan 65 jaar.

Epidemieën kunnen tevens leiden tot absentie van arbeiders en scholieren en daarmee economische schade veroorzaken (WHO Influenza fact sheet, 2014).

Influenza pandemieën (uitbraken die grote delen van de wereld bestrijken vanwege de introductie van een nieuw influenzavirus dat niet eerder in mensen waargenomen is, zoals bv. de Spaanse (1918), Aziatische (1957) en Hongkong (1968) griepandemieën in de vorige eeuw) zijn onvoorspelbaar maar terugkerende gebeurtenissen die wereldwijd grote gezondheids-, economische en maatschappelijke gevolgen hebben. Hiervoor zijn meerdere parallelle factoren betrokken: een vogelgriepvirus dat in staat is om blijvende mens-op-mens transmissie te bewerkstelligen waarbij het een virus betreft waarvoor geen of nauwelijks immuniteit tegen is opgebouwd in de populatie. Door de wereldwijde toename in handel en reismogelijkheden kan een lokale epidemie snel omslaan naar een infectie op pandemische

schaal waarbij weinig tijd beschikbaar is om accurate maatregelen te nemen vanuit het oogpunt van de volksgezondheid. Recentelijk zijn vogelgriepvirussen A(H5N1) en A(H7N9) geïdentificeerd als zijnde virussen die potentieel een pandemie zouden kunnen veroorzaken, omdat ze blijven circuleren in pluimvee, de meeste mensen geen immuniteit tegen deze stammen hebben en zo dus ernstige ziekte en sterfte kunnen veroorzaken. Daarnaast kan niet uitgesloten worden dat influenzavirussen uit andere bronnen zoals bv. varkens, ook pandemisch potentieel hebben (WHO Avian Influenza fact sheet, 2014). De resultaten verkregen in de dierproeven beschreven in dit project voorstel zullen gebruikt worden om nieuw ontwikkelde en misschien beter werkende vaccins te registreren of om de vaccin productie op te schalen indien de snelheid van de uitbraak dit noodzaakt.

Wetenschappelijk belang:

Vergelijkbare studies die door ons in het verleden zijn uitgevoerd zijn beschreven in internationale peer-reviewed tijdschriften [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] en gepresenteerd op internationale symposia. De studies binnen dit project maken deel uit van onderzoeksprogramma's voor de productie van nieuwe vaccin(concepten) tegen bestaande en/of nieuwe influenzavirussen en van bestaande vaccins tegen nieuwe influenzavirussen. Resultaten zullen gebruikt worden voor het registreren van het betreffende influenza vaccin, maar net als bij de hierboven aangehaalde eerdere studies ook beschreven worden in internationale peer-reviewed tijdschriften en gepresenteerd worden op internationale symposia. Door middel van het publiceren of presenteren van de betreffende resultaten, kunnen deze resultaten gebruikt worden door zowel de wetenschappelijke gemeenschap maar ook door vaccinproducenten om bv. een bepaald vaccinontwikkelingsprogramma te optimaliseren om zo sneller te komen tot een beter vaccin. In het kader hiervan kan ook gedacht worden aan het verder ontwikkelen van adjuvantia ter verbetering van de immunrespons.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

In de studies welke binnen dit project vallen zullen dieren 1 of 2 maal gevaccineerd worden tegen influenza en zal vervolgens bestudeerd worden of dieren na vaccinatie daadwerkelijk beschermd zijn tegen challenge met influenza. De volgende parameters zullen bestudeerd worden, maar niet noodzakelijkerwijs moeten alle parameters voor ieder virus uitgelezen worden:

- Wel of niet ontwikkelen van een humorale en/of cellulaire immunrespons na vaccinatie
- Wel of niet bescherming tegen replicatie van influenza virus in de bovenste luchtwegen
- Wel of niet bescherming tegen replicatie van influenza virus in de onderste luchtwegen
- Wel of niet bescherming tegen replicatie van influenza virus in andere weefsels (in het geval van een systemische infectie)
- Wel of niet bescherming tegen ontwikkelen van klinische verschijnselen en/of pathologie

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

NB: aangezien het hier een project aanvraag betreft voor meerdere afzonderlijke dierstudies, zijn de hoofdlijnen zeer algemeen omschreven. Specieke details (bijvoorbeeld aantal vaccinaties, vaccinatie scheme, challenge route, e.d.) zullen in detail omschreven worden in de afzonderlijk in te dienen werkprotocollen.

Effectiviteitsstudie tegen challenge met influenza virus:

1. Aanbrengen van een subcutane identificatie chip, vaccinatie tegen rabiës en bloedafname bij de leverancier voor serologische pre-screening (antilichamen tegen influenza virus en Aleutian disease virus)
2. Bepalen lichaamsgewicht op dag van binnenkomst, op een vast aantal dagen tijdens de looptijd van de

studie en op de dag van (vroegtijdige) dood. Daarnaast zal op tussenliggende dagen het lichaamsgewicht bepaald worden indien dit noodzakelijk is in verband met welzijnsbewaking.

3. Standaard huisvesting in groepen van ■■■ dieren van dag van binnenkomst tot de dag van challenge, acclimatisatie voor minimaal een week.
4. Na acclimatisatie implantatie van een temperatuurlogger in de peritoneale holte (minimaal 14 dagen voor start van de studie) onder sedatie.
5. Huisvesting onder DM2 of DM3 (isolatoren) inperking in groepen van ■■■ dieren tijdens de challenge fase van de studie.
6. Immunisatie onder sedatie van alle dieren op een vooraf bepaald aantal dagen met een vooraf bepaald interval.
7. Bloedafnames onder sedatie op een vast aantal tijdstippen waarbij de hoeveelheid niet meer zal bedragen dan 7-8 ml/kg/maand
8. Intratracheale en/of intranasale challenge met influenza virus onder sedatie.
9. Afnemen van monsters vlak voor challenge (nul monster) en elke dag na challenge tot en met de dag van (vroegtijdige) dood onder sedatie.
10. Euthanasie op een vooraf bepaald tijdstip na challenge door verbloeden onder sedatie.
11. Gross pathologie en verzamelen van weefsel (o.a. long en/of turbinaat, maar ook andere organen indien dit relevant is voor het gebruikte virus) voor virologie en histopathologische beoordeling.

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.

Aangezien iedere bij de IvD aangevraagde dierstudie op deze aanvraag een afzonderlijke dierstudie zal zijn, is er niet echt sprake van een logische samenhang tussen de verschillende studies behalve dat het allen studies betreffen naar het uittesten van de effectiviteit van vaccins tegen influenza in fretten.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

4.



Centrale Com

Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u 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.	90500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten.</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten.
Volgnummer	Type dierproef					
1	Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten.					

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De experimenten die zullen worden uitgevoerd in het kader van dit project voorstel, zullen gebruikt worden om de effectiviteit van al dan niet geadjuveerde influenza vaccins te bestuderen. Hiervoor zullen dieren 1 of 2 maal gevaccineerd worden in de aanwezigheid of afwezigheid van een adjuvans. Zowel de keuze van het betreffende vaccin, de vaccinatie strategie als het challenge virus bepalen de primaire uitleesparameter. Aangezien de combinatie van deze drie van tevoren niet bekend is, kan in deze beschrijving geen specifieke primaire uitkomstparameter gedefinieerd worden, maar zal deze in het betreffende werkprotocol beschreven en gemotiveerd worden.

De volgende uitkomstparameters kunnen gebruikt worden in de studies van het huidige projectvoorstel. Zoals hieronder is weergegeven is het voor hoog pathogeen influenza mogelijk om meerdere uitleesparameters te definiëren, echter zal per studie een bepaalde primaire uitleesparameter gekozen worden mede op basis van het te gebruiken preparaat en, indien beschikbaar, eerder verkregen data in andere studies:

Uitleesparameter	LP influenza	HP influenza
1 Reductie van hoogte of tijdsduur van virale spreiding in de bovenste luchtwegen	++	+
2 Reductie van virale load in respiratoire weefsel of andere organen (bij verwachting van systemische infectie)	+	++
3 Reductie van gross-pathologie of microscopische pathologie in respiratoire weefsels	+	++
4 Reductie van klinische symptomen zoals koorts, gewichtsverlies of activiteit	+	++
5 Inductie van humorale en/of cellulaire immunoresponsen	+	+

+	Uitleesparameter
++	Primaire uitleesparameter
LP influenza	laag pathogeen influenza
HP influenza	hoog pathogeen influenza

Daarnaast zal ook gekeken worden of de bescherming gecorreleerd kan worden aan de geïnduceerde humorale en/of cellulaire immunorespons (z.g. correlates of protection). Dat dit op voorhand geen uitkomst biedt hebben studies in het verleden echter aangetoond, zoals bv. beschreven in Baras et al. (PloS One, 2008), waarin fretten waarin geen meetbare humorale immunorespons meetbaar was toch beschermd bleken tegen infectie met HP H5N1. Voor de studies in het huidige projectvoorstel zijn challenge infecties dan ook noodzakelijk om daadwerkelijk vast te kunnen stellen of de te testen vaccins bescherming bieden tegen infectie met influenzavirus.

Indien uit de studies in dit voorstel deze correlates of protection duidelijker gedefinieerd kunnen worden, zouden in toekomstige experimenten de primaire uitkomstparameters in het meest gunstige geval ook kunnen dienen als DE primaire uitkomstparameter, waardoor challenge niet meer nodig zou zijn en ongerief tot een minimum beperkt kan blijven.

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

Voorafgaand aan het ontwerp van de fretten studie, zal de opdrachtgever, gevraagd worden om eerder gevonden ondersteunende data te overhandigen. Hierbij kan gedacht worden aan studies in bijvoorbeeld muizen waarin, alhoewel het muizenmodel niet representatief is voor de mens, voorwerk is uitgevoerd naar de uit te testen vaccin preparaten (bijvoorbeeld een grote doseringsreeks). Deze data zullen vervolgens gebruikt worden om tot een zo compleet mogelijke studie te komen, waarbij met een hoge mate van zekerheid een gegronde uitspraak gedaan kan worden over de uit te testen middelen. In veel gevallen betreft de fretten studie de laatste halte voor de overgang naar de mens, mede vanwege het feit dat een effectiviteitsstudie voor veel virussen, vanwege pathogeniciteit, ethisch niet verantwoord is in de mens. In sommige gevallen is het zelfs zo, dat de studie uitgevoerd met fretten, the proof-of-principle studie is, omdat vanwege de hoge pathogeniciteit bijvoorbeeld een humaan challenge model niet ethisch verantwoord uit te voeren is.

In grove lijnen ziet een studie eruit als hieronder puntsgewijs is aangegeven. Vervolgens is per fase (acclimatisatie, vaccinatie en challenge fase) meer in detail weergegeven wat de handelingen zijn in waarvoor gekozen zal worden voor bepaalde strategieën.

1. Aanbrengen van een subcutane identificatie chip, vaccinatie tegen rabiës en bloedafname bij de leverancier voor serologische pre-screening (antilichamen tegen influenza virus en Aleutian disease virus)
2. Bepalen lichaamsgewicht op dag van binnenkomst, op een vast aantal dagen tijdens de looptijd van de studie en op de dag van (vroegtijdige) dood. Daarnaast zal op tussenliggende dagen het lichaamsgewicht bepaald worden indien dit noodzakelijk is in verband met welzijnsbewaking.
3. Standaard huisvesting in groepen van ■■■ dieren van dag van binnenkomst tot de dag van challenge, acclimatisatie voor minimaal een week.
4. Na acclimatisatie implantatie van een temperatuurlogger in de peritoneale holte (minimaal 14 dagen voor start van de studie) onder sedatie.
5. Huisvesting onder DM2 of DM3 (isolatoren) inperking in groepen van ■■■ dieren tijdens de challenge fase van de studie.
6. Immunisatie onder sedatie van alle dieren op een vooraf bepaald aantal dagen met een vooraf bepaald interval.
7. Bloedafnames onder sedatie op een vast aantal tijdstippen waarbij de hoeveelheid niet meer zal bedragen dan 7-8 ml/kg/maand
8. Intratracheale en/of intranasale challenge met influenza virus onder sedatie.

9. Afnemen van monsters vlak voor challenge (nul monster) en elke dag na challenge tot en met de dag van (vroegtijdige) dood onder sedatie.

10. Euthanasie op een vooraf bepaald tijdstip na challenge door verbloeden onder sedatie.

11. Gross pathologie en verzamelen van weefsel (o.a. long en/of turbinaat, maar ook andere organen indien dit relevant is voor het gebruikte virus) voor virologie en histopathologische beoordeling.

Acclimatisatie fase:

Na binnenkomst, vervolgens wekelijks en na challenge infectie dagelijks, zullen de dieren gewogen worden om de algemene gezondheidsstatus te volgen. Tevens zal een welzijnsformulier bijgehouden worden gedurende de looptijd van het experiment. Een acclimatisatieperiode van minimaal 7 dagen zal worden aangehouden. Minimaal 14 dagen voor de start van het experiment zal een zgn. nul-bloedmonster voor referentie in analyses afgenomen worden onder sedatie via de vena jugularis waarna een temperatuurlogger ingebracht zal worden. Dit zal gebeuren door middel van een operatie waarbij de buikwand geopend zal worden en de temperatuurlogger via de linea alba in de peritoneale holte geplaatst zal worden waarna de wond gehecht wordt. Deze temperatuurlogger meet de lichaamstemperatuur van het dier gedurende de looptijd van de studie (klinische parameter). Naderhand zullen de dieren pijnbestrijding krijgen om het genezingsproces te bevorderen.

Vaccinatie fase:

Om de werkzaamheid van de te testen vaccins te bepalen zullen de dieren gevaccineerd worden volgens een vooraf bepaald regime welke afhankelijk is van het gekozen preparaat (bv prime, dag 0, boost, dag 21, regime in het geval van een geïnactiveerd antigeen of een enkele vaccinatie in het geval van bijvoorbeeld een levend verzwakt virus). Tijdens deze vaccinatie fase zal op bepaalde tijdstippen afhankelijk van het vaccinatie regime bloed afgenomen worden onder sedatie via de vena jugularis om de immunologische respons te meten. Bloedafname zal beperkt worden tot een hoeveelheid die benodigd is voor de verschillende uit te voeren laboratorium testen, maar zal nooit meer zijn dan de maximale toegestane hoeveelheid van 7-8 ml/kg/maand.

Challenge fase:

Om specifieke bijwerkingen van een eventueel adjuvans te beperken, zullen de dieren op vier weken na de (laatste) vaccinatie via de intranasale en/of intratracheale route gechallengeed worden met influenza virus en gedurende een bepaald aantal dagen (bv 4 dagen bij laag-pathogeen en 5 dagen bij hoog-pathogeen influenza virus) vervolgd worden om de klinische verschijnselen te bestuderen en om monsters af te nemen voor het bepalen van de virus verspreiding uit de luchtwegen om de effectiviteit van het vaccin te kunnen bepalen.

De route van de virale challenge is gebaseerd op het te gebruiken challenge virus: hoog pathogene influenza stammen repliceren voornamelijk in de lagere luchtwegen aangezien daar de specifieke receptoren voor deze stammen aanwezig zijn en zullen dus via de intratracheale route gechallengeed worden. Laag pathogene virussen repliceren juist voornamelijk in de bovenste (en soms in de onderste) luchtwegen en dus zal de challenge van deze virussen via de intranasale (en eventueel gelijktijdig via de intratracheale) route verlopen. Het kan echter ook zijn dat vaccinatie tegen laag pathogeen virus, welke hoofdzakelijk in de bovenste luchtwegen replicateert, maar in bepaalde gevallen door kan slaan naar de lagere luchtwegen, als doel heeft om lagere luchtweg infectie in bijvoorbeeld bijzondere doelgroepen te voorkomen. In dat geval kan het zijn dat dit laag pathogeen virus zowel via de intranasale weg als via de intratracheale weg wordt toegediend om ervoor te zorgen dat de infectie zowel in de bovenste als in de onderste luchtwegen aanslaat en zoveel mogelijk de humane situatie nabootst.

De tijdsduur van de opvolgdagen is voornamelijk bepaald door het gekozen challenge virus en het moment waarop verschillen tussen beschermde en onbeschermde dieren naar verwachting het meest duidelijk is, op basis van de primaire uitleesparameter: dit is op dag 4 voor laag pathogene virussen en dag 5 voor hoog pathogene virussen. Het verloop van de infecties van laag pathogene virussen is zodanig dat het ongerief voor de dieren niet hoger zal zijn dan 'matig'. Het verloop van de infecties van hoog pathogene virussen is zodanig dat het ongerief de categorie 'ernstig' kan bereiken in onbeschermde groepen. Het is voor het bepalen van de werkzaamheid van de te testen vaccins tegen hoog pathogeen virus van belang dat alle dieren tot op dag 5 gevolgd kunnen worden omdat de resultaten die worden verkregen bij necropsie (de primaire uitleesparameter) in het geval van vroegtijdig euthanaseren van bv. (onbeschermde) dieren in de controlegroep onderling niet meer te vergelijken zijn. Uiteraard zal in het geval van het bereiken van humane eindpunten het betreffende dier geëuthanaseerd worden.

Daarnaast kan het eindpunt ook nog bepaald worden aan de hand van andere uitleesparameters, zoals bijvoorbeeld pathologie. Op dit vooraf bepaalde vaste tijdstip na de challenge zullen de dieren geëuthanaseerd worden pathologie en het bepalen van de virus load in verschillende (respiratoire weefsels). De aanpak van de verschillende studies zal gebaseerd worden op resultaten behaald in eerdere studies waarvan meerdere gepubliceerd zijn (bv. [REDACTED]). Aangezien het voor elke studie een maatwerk protocol betreft voor vaccinatie regime, challenge virus, opvolgtijd en primaire uitkomstparameter, is op voorhand dit niet te beschrijven voor elke combinatie.

De scenario's voor de studies met hoog- dan wel laag pathogeen influenza virus (deze zijn uitgeschreven in de beschrijving, hieronder in een lijst), *allen op basis van vaccins die al dan niet geadjuveerd één of tweemaal toegediend worden voor het moment van challenge infectie* zijn hieronder weergegeven. Echter voor een specifiek vaccin preparaat tegen een bepaald virus (hoog of laag pathogeen) kan gekozen worden voor alternatieve/additionele tijdstippen voor vaccinatie, afname van bloedmonsters en/of challenge:

- **Hoog pathogeen influenza challenge infectie (prime-boost):**
 - Pre-bloedmonster en plaatsing temperatuurloggers (d-16)
 - Vaccinatie #1 (Prime, d0)
 - Vaccinatie #2 en bloedmonster (Boost, d21)
 - Post-vaccinatie bloedmonster (d42)
 - pre-challenge bemonstering (d48)
 - challenge infectie (d49)
 - dagelijkse post-infectie swabs (d50 – 53)
 - bemonstering en euthanasie (d54)
- **Hoog pathogeen influenza challenge infectie (prime only):**
 - Pre-bloedmonster en plaatsing temperatuurloggers (d-16)
 - Vaccinatie #1 (Prime, d0)
 - Post-vaccinatie bloedmonster (d21)
 - pre-challenge bemonstering (d28)
 - challenge infectie (d29)
 - dagelijkse post-infectie swabs (d30 – 33)
 - bemonstering en euthanasie (d34)
- **Laag pathogeen influenza challenge infectie (prime-boost of prime-only):**
 - Identiek als hierboven beschreven voor hoog-pathogeen virus, echter de opvolgtijd na challenge is in beide gevallen verkort met 1 dag. Dus euthanasie op d53 en d34 voor respectievelijk prime-boost en prime only.

Ter informatie is hieronder een voorbeeld gegeven van een studie waarbij een al dan niet geadjuveerd geïnactiveerd vaccin wordt getest tegen infectie met hoog pathogeen influenza virus:

Influenza Vaccine - Immunisation, Challenge & Sampling Schedule									
Group	No./Group	Immunisation & Sampling				Challenge			
		d -16	d 0	d 21	d 42	d 48	d 49	d 50 - d 53	d 54
						d -1	d0	d1 - d4	d5
1	■	TS, B	B	PBS control	B	PBS control			
2	■	TS, B	B	Adjuvant control	B	Adjuvant control			
3	■	TS, B	B	high dose Ag without adjuvant	B	high dose Ag without adjuvant			
4	■	TS, B	B	high dose Ag with adjuvant	B	high dose Ag with adjuvant			
5	■	TS, B	B	middle dose Ag without adjuvant	B	middle dose Ag without adjuvant			
6	■	TS, B	B	middle dose Ag with adjuvant	B	middle dose Ag with adjuvant			
7	■	TS, B	B	low dose Ag without adjuvant	B	low dose Ag without adjuvant			
8	■	TS, B	B	low dose Ag with adjuvant	B	low dose Ag with adjuvant			
HOUSING		NORMAL				ISOLATOR			
						S, C, W	Intratracheal challenge highly pathogenic influenza virus	S	S, W, LT, LW, N

Abbreviations:

* B = whole blood; S = throat & nose swabs; LT = lung tissue after sacrifice; TS = temp sensor implantation; W = body weight; LW = lung weight; N = necropsy

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

Reeds gepubliceerde en publiekelijk beschikbare (maar ook niet publiekelijk beschikbare) studies zullen gebruikt worden om spreiding van de vooraf bepaalde primaire uitkomstparameter te bepalen en daarnaast zal bepaald worden welke vermindering van die primaire uitkomstparameter een juiste maat is voor de werkzaamheid. Deze gegevens zullen als basis dienen voor het bepalen van de benodigde groepsgrootte. Daarnaast dient de publicatie van Richardson en Overbaugh (J Virol 2005) als leidraad voor de groepsgrootte bepaling: een groepsgrootte van ■ dieren is het minimale aantal dieren per groep voor experimenten waarbij de uitleesparameter is bepaald door de uitkomst van een virale infectie.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoort: fretten

Fretten zijn gevoelig voor infectie met wild-type klinische relevante influenza virussen en derhalve worden fretten bijvoorbeeld ook regelmatig gebruikt voor het genereren van anti-sera voor het typeren van influenza virussen. Daarnaast zijn de klinische verschijnselen geobserveerd in fretten overeenkomstig met de klinische verschijnselen in mensen. En het testen van de effectiviteit van een vaccin kan alleen maar getest worden in een intacte gastheer met een functionerend immuunsysteem en het is in de meeste gevallen niet ethisch verantwoord om dit in mensen uit te voeren. Op basis van de zogenaamde "animal rule" kunnen in sommige gevallen de uitkomst(en) van een fretten experiment direct gebruikt worden voor registratie van humane vaccins.

Herkomst: geregistreerde fokker in de EU

Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt. Derhalve kunnen de resultaten verkregen in de afzonderlijke dierstudies ook daadwerkelijk gebruikt worden in het registratie proces van de uit te testen preparaten.

Geschat aantal: 600 dieren

Een gemiddelde studie bestaat uit ■ groepen van ■ dieren per groep en per jaar kunnen twee van dergelijke studies uitgevoerd worden. Voor een overzicht van mogelijke groepen zie het schema hierboven bij vraag A. Zoals hierboven beschreven betreft iedere studie een maatwerk protocol en kan dit niet op voorhand uitgespeld worden. Echter de keuze van de groepen zal voorgelegd worden aan de IvD ter goedkeuring. Met een gemiddeld aantal van ■ dieren per studie en twee studies per jaar voor een periode van 5 jaar betekent dat een totaal aantal van ■ = 600 dieren.

Een groepsgrootte van ■ dieren is zowel bepaald uit reeds beschikbare data (gepubliceerde en niet-gepubliceerde studies zoals o.a. ■) en zie hieronder voor een voorbeeld van een dergelijke berekening of op basis van de publicatie van Richardson en Overbaugh (J Virol 2005) indien het een primaire uitkomst parameter betreft die nog niet eerder gemeten/beoordeeld is. Echter indien van te voren bekend is dat verschillen tussen de verschillende experimentele groepen klein is of dat vanwege regulatoire doeleinden een groter aantal dieren per groep nodig is, zal aanvullende informatie aangeleverd worden voor het rechtvaardigen van een grotere groepsgrootte en deze zal ter beoordeling ingediend worden bij de IvD.

Voorbeeld power berekening (echter deze zal voor elke studie en elke uitkomstparameter anders zijn):

De power berekening hieronder is gebaseerd op de resultaten beschreven in het artikel "■". In deze studie is de gemiddelde virustiter in de long van ■ dieren die gevaccineerd met H1N1 antigenen, maar zonder adjuvans $\log_{10}(5,38)$ TCID₅₀, en de gemiddelde virustiter van ■ dieren die gevaccineerd zijn met H1N1 antigenen en adjuvans $\log_{10}(2,22)$ TCID₅₀. De standaard deviaties zijn $\log_{10}(2,19)$ en $\log_{10}(1,32)$ voor respectievelijk de groep zonder en met adjuvans.

Aangenomen wordt dat het hier uit te testen adjuvans dezelfde adjuvans effect heeft als het adjuvans in de hierboven genoemde studie. Dit leidt tot de volgende powerberekening:

$$n = 2x[\{(z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})\sigma\} / (\mu_1 - \mu_0)]^2$$

$$\alpha = 0,05; 1-\beta = 0.8 \text{ (power van 80\%)}$$

$$\sigma_{\text{pooled}} = 1,81 \text{ (gepoolde standaard deviatie tussen de twee groepen)}$$
$$= \text{wortel} \left(\frac{[n_1 * sd_1^2 + n_2 * sd_2^2]}{[n_1 + n_2]} \right)$$

$$= \sqrt{[6 \cdot 2,19^2 + 6 \cdot 1,32^2] / [12]}$$

$$\mu_1 - \mu_0 = 3,16 \text{ (verschil tussen de twee groepen in log units [= } \log_{10}(5,38) - \log_{10}(2,22)\text{)]}$$

n wordt dan ■ dieren (■ naar boven afgerond) per groep. Uitgaande van een power van 80%, een waarde die we ook hanteren bij de studie zoals die is beschreven in deze DEC aanvraag, zijn we met deze groeps-grootte dus in staat om significante verschillen aan te tonen in virus titers in de longen van de dieren na H1N1 challenge infectie.

Levensstadium: 6-12 maanden oud bij start van het experiment

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: deze dierproef is opgezet om de effectiviteit van vaccins te bestuderen tegen infectie met influenza virus. Dergelijke studies zijn niet mogelijk zonder in vivo modellen met een intact immuunsysteem. Daarnaast zijn fretten het kleinste mogelijke proefdiermodel voor influenza studies aangezien fretten, in tegenstelling tot bijvoorbeeld muizen, wel geïnfecteerd kunnen worden met klinische relevante wild-type virussen en daarnaast lijkt de kinetiek en de klinische verschijnselen van de infectie op die van de mens.

Vermindering: Op basis van eerdere experimenten is gekomen tot een gewenste/maximale groeps-grootte van ■. De vermindering zit hier dus in het voortraject. De keuze voor influenzavirussen die gebruikt worden voor de challenge infectie is mede ingegeven door vermindering van het aantal benodigde dieren: er wordt gebruik gemaakt van influenzavirussen die waarvoor de optimale infectiedosis al is vastgesteld – er zijn dus geen dieren meer nodig om de juiste dosis vast te stellen. Daarnaast is door een goed ontwerp en statistische analyse verzekerd dat het optimale aantal dieren wordt gebruikt. Tevens zullen dieren uit een gelimiteerde genetische pool gebruikt worden, zodat zo min mogelijk verschil te verwachten is tussen de dieren. Ook zullen de dieren onder een SPF-compliant regime gehuisvest worden, waardoor we geen ongewenste secundaire infecties hebben die kunnen interfereren met de studie.

Verfijning: Invasieve handelingen zullen uitgevoerd worden onder sedatie. Er zullen zoveel mogelijk handelingen tijdens hetzelfde sedatiemoment worden uitgevoerd zoals vaccinatie, bloedafname. Wanneer de dieren gesedeerd zijn worden ze ook gewogen. Maximaal zullen er per dierstudie ongeveer 10 sedatie momenten zijn. Daarnaast zullen de dieren dagelijks geobserveerd en indien dit noodzakelijk bevonden wordt vanuit een welzijnsstandpunt gewogen worden. De hoogte van intensivering is mede bepaald door fase waarin de studie zich bevindt. Tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van influenza een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt. Met andere woorden: er wordt verwacht dat de dieren het humane eindpunt al bereikt hebben bij het reguliere volgende controle moment.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat dieren gehuisvest zullen worden onder minimaal een DM2 regime (minimaal DM3 regime in het geval van hoog pathogene virussen), handelingen uitgevoerd zullen worden in een veiligheidskabinet onder

ML2 of ML3 regime en afval (bedding, kadavers en andere materialen gebruikt in de studie) aangeboden zal worden voor destructie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Bij de aanvraag (indienen van werkprotocol) van elk experiment zal met behulp van literatuur studie maar ook in overleg met de verstrekker van het betreffende vaccin steeds gekeken worden of dat betreffende experiment niet al eerder is uitgevoerd.

Tevens betreft het hier in de meeste gevallen een studie die vanuit regulatorisch oogpunt uitgevoerd dient te worden voordat het hier uit te testen vaccin in een klinische studie uitgetest kan worden.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Dieren kunnen als gevolg van de infectie een longontsteking ontwikkelen met de daarbij behorende verschijnselen als kortademigheid en gewichtsverlies. Echter, in het algemeen hebben analgetica ook een ontstekingsremmende werking en dergelijke bijverschijnselen zijn niet verenigbaar met het uitvoeren van infectie experimenten waarbij ook het immuunsysteem deel uitmaakt van het werkingsmechanisme. Negatieve effecten als gevolg van vaccinatie is verwaarloosbaar klein aangezien het merendeel van de preparaten ook voor humaan gebruik zal zijn.

NB: bij het implanteren van de temperatuurlogger in de peritoneale holte zullen de dieren wel degelijk

pijnstilling krijgen. Dit is mede gerechtvaardigd aangezien de relatief kortdurende werking van de pijnstilling op minimaal 14 dagen voor start geen invloed heeft op het betreffende experiment.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Eventuele verwondingen door agressie binnen de groep.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Gebruik van dieren die niet samen gehuisvest kunnen worden.

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

De experimenten zullen hoofdzakelijk uitgevoerd worden met vrouwelijke dieren, aangezien agressie onderling minder aangemelijk is dan bij groepshuisvesting van mannelijke dieren. Echter, indien vanuit bijvoorbeeld regulatorisch oogpunt juist met mannelijke dieren gewerkt dient te worden, zullen of kleinere groepen geformeerd worden of gezocht worden naar dieren welke al langer bij elkaar gehuisvest zijn.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tijdens de vaccinatie fase van de betreffende dierproeven is het onwaarschijnlijk dat de dieren dusdanig ongerief zullen vertonen als gevolg van de behandeling, dat ze uit de studie genomen dienen te worden. Dit is mede gebaseerd op het feit dat de preparaten die gebruikt zullen worden als vaccin ook gebruikt zullen worden in de mens. Niet preparaat gerelateerde verschijnselen duiden tijdens de vaccinatie fase op een specifiek onderliggend leiden en de dieren zullen bij het volgende criterium geëuthanaseerd worden om te bepalen wat de oorzaak is en welke impact het heeft op het verloop van de studie:

- Gewichtsverlies: tijdens de vaccinatie fase worden de dieren wekelijks gewogen. Indien een dier in twee achtereenvolgende weken beperkt (<10%) gewichtsverlies laat zien (geclassificeerd als matig ongerief; de dieren worden ingezet op een leeftijd dat ze stabiel in lichaamsgewicht zijn), zal het dier vaker gewogen worden en apart gezet worden om voedsel en vocht opname te controleren. Dit wordt uitgevoerd door terugwegen van het voer en bestuderen van het waterniveau in de drinkfles. Indien de dieren 20% of meer gewicht verliezen t.o.v. startgewicht op dag 0 van de studie zullen ze geëuthanaseerd worden.

Tijdens de challenge fase kunnen ook infectie gerelateerde verschijnselen optreden welke leiden tot de volgende humane eindpunten welke uitgesplitst zijn per virus, te weten laag en hoog pathogeen. Bij het vertonen van een (in het geval van laag-pathogeen virus) of twee (in het geval van hoog pathogeen virus) van de volgende humane eindpunten zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

Laag pathogeen virus:

- Gewichtsverlies: tijdens de challenge fase worden de dieren dagelijks gewogen. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier 10% of meer gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van challenge (hoewel de middelen daartoe erg beperkt zijn, kan ook bekeken worden tijdens de challenge fase of een betreffend dier solitair gehuisvest kan worden).

NB: Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie. Omdat deze verhoogde ademhaling frequentie niet wordt beschouwd als hoger ongerief dan dat wordt veroorzaakt door herhaalde bemonstering (matig), is dit geen humaan eindpunt bij laag pathogene virussen.

Hoog pathogeen virus:

- Gewichtsverlies: tijdens de challenge fase worden de dieren dagelijks gewogen. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier 20% of meer gewicht verliest (geclassificeerd als ernstig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van challenge (hoewel de middelen daartoe erg beperkt zijn, kan ook bekeken worden tijdens de challenge fase of een betreffend dier solitair gehuisvest kan worden).
- Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van een verhoogde ademhalingsfrequentie (matig ongerief) naar moeizaam ademen (ernstig ongerief) of zelfs een stokkende ademhaling (dyspnoe). De moeizame ademhaling is te zien aan het meedoen van de flanken van het dier bij het ademen. Daarnaast kan het zo zijn dat het betreffende dier niet meer bij de andere dieren (opgerold) ligt, maar juist apart gaat liggen en gestrekt om het ademen te vergemakkelijken.
- Diarree: indien in de huisvesting te zien is dat een of meerdere dieren diarree (geclassificeerd als matig) hebben, zullen alle dieren afzonderlijk beoordeeld worden om te bepalen of er aanwijzingen zijn (vuile vacht rond de anus) welke dieren daadwerkelijk diarree vertonen.

Laag of hoog pathogeen virus:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (beide geclassificeerd als ernstig ongerief):

- Neurologisch: in enkele gevallen kan het virus vanuit de neus van het dier doorslaan naar de hersenen en zo een ontsteking van de hersenen induceren. De daarbij behorende verschijnselen zijn onstabiele gang en ongecontroleerde bewegingen (zoals beschreven in Bodewes et al 2015 AJP).

Lethargie: indien een dier lethargisch is (m.a.w. als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

Vaccinatie fase:

Eerdere studies uitgevoerd door de aanvrager hebben laten zien dat vaccin gerelateerde bijwerkingen niet voorkomen, dus de kans op het ontstaan van ongerief als gevolg van de vaccinatie is 0%. Echter is het mogelijk dat een andere factor de veroorzaker is van matig ongerief, op basis van ervaringen in eerdere studies is dit ongerief ingeschaald op $\leq 5\%$.

Challenge fase met laag-pathogeen virus:

Klinische verschijnselen na infectie met laag pathogene (seizoens)influenzavirussen komen zeer zelden voor, $\leq 5\%$ (het waarnemingspercentage in eigen experimenten in het verleden is 0%).

Challenge fase met hoog-pathogeen virus:

In het geval van hoog pathogene ("emerging", pandemische, aviaire) influenzavirussen is de kans op ernstig ongerief variabel: 0 - 100%, afhankelijk van de werkzaamheid van het uit te testen preparaat. In de negatieve controlegroepen (geen behandeling of behandeling met alleen adjuvans) kan dit percentage oplopen tot 100%. De kans dat dieren ernstig ongerief zullen ondergaan is afhankelijk van het uit te testen preparaat en zal dus per studie variëren. Echter indien al data beschikbaar zijn over de werkzaamheid van het betreffende vaccin in bijvoorbeeld andere diermodellen, kan een uitspraak gedaan worden voor de uit te voeren studie in fretten en zal dit vermeld worden in het betreffende werkprotocol van die studie.

Challenge fase met laag of hoog pathogeen virus:

Neurologische verschijnselen worden maar zelden geobserveerd, derhalve wordt de kans op dit ernstige ongerief ingeschaald op $\leq 5\%$. De kans dat dieren moribund zullen worden is afhankelijk van het uit te testen preparaat en zal dus per studie variëren. Echter indien al data beschikbaar zijn over de werkzaamheid van het betreffende vaccin in bijvoorbeeld andere diermodellen, kan een uitspraak gedaan worden voor de uit te voeren studie in fretten en zal dit vermeld worden in het betreffende werkprotocol van die studie. Zie onderstaande tabel uit Baras et al. (PloS One, 2008) waarin met vergelijkbare vaccins in identieke protocollen als die in dit voorstel beschreven is gewerkt.

Vaccination regimen	Dead/Total (% survival ^c)
Adjuvant alone	6/6 (0)
Unadjuvanted H5N1 (15 µg)	6/6 (0)
Adjuvanted H5N1 (1.7 µg)	1/6 (83)
Adjuvanted H5N1 (3.8 µg)	0/6 (100)
Adjuvanted H5N1 (7.5 µg)	0/5 (100)
Adjuvanted H5N1 (15 µg)	0/6 (100)

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Zie voor de verdeling van de verschillende fasen hierboven bij 2J

Cumulatief ongerief tijdens de vaccinatie fase: matig

Cumulatief ongerief bij gebruik van laag pathogene virussen (normaal ziektebeeld): matig

Cumulatief ongerief bij gebruik van hoog pathogene virussen (normale ziektebeeld): ernstig

Cumulatief ongerief bij gebruik van laag en hoog pathogene virussen (zeldzame ziektebeeld): ernstig

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Dieren zullen worden gedood om vervolgens onder andere de virale load in de longen te bepalen, maar ook de pathologie. Deze bepaling is niet mogelijk bij het in leven blijven van de dieren.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

Vragen d.d. 13 juli 2015:

- Nadere toelichting en beschrijving m.b.t. wetenschappelijke achtergrond, referenties aan sleutelpublicaties, de maatschappelijke last van influenza virusinfecties, het belang van dit project, en de eigen ervaring/achtergrond van de instelling m.b.t. dit onderzoeksgebied.
- Toelichting m.b.t. de haalbaarheid van dit project.
- Toelichting en onderbouwing van de uitkomstparameters.
- Aanvullende beschrijving van de experimentele handelingen.
- Toelichting en onderbouwing van het ongerief in relatie tot de humane eindpunten.
- Nadere toelichting op de humane eindpunten en het percentage dieren dat naar verwachting het humane eindpunt zal halen.
- Tekstueel en redactioneel (verduidelijking en onderlinge afstemming van bepaalde tesktpassages en correcte invulling van het formulier).
Aanpassing van de NTS conform de toelichting bij het formulier.

Vragen d.d. 07 augustus 2015:

- Nadere beschrijving van de achtergrond en positie van de instelling t.o.v. derden (opdrachtgevers).
 - Nadere informatie over de herkomst, het voortraject en de ingangscriteria voor de te testen vaccins.
 - Toelichting m.b.t. de haalbaarheid van dit project.
 - Tekstueel en redactioneel (verduidelijking en onderlinge afstemming van bepaalde tesktpassages en correcte invulling van het formulier).
- Datum antwoord: 22 juli 2015 en 27 augustus 2015
 - Strekking van de antwoorden: De vragen en opmerkingen van de DEC zijn naar tevredenheid beantwoord. Aanvraag na aanpassing compleet en duidelijk.
 - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t., de DEC zelf beschikt over de relevante expertise.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

- 1.** Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project of de aanvrager.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
- X wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Jaarlijks circulerende seizoensinfluenzavirussen kunnen in gezonde personen een milde infectie veroorzaken. Bij kwetsbare groepen kan ook infectie met zulke laag pathogene influenzavirussen leiden tot een ernstig ziektebeeld. Pandemische, hoog pathogene influenzavirussen kunnen ook bij gezonde personen ernstige ziekte veroorzaken. Doordat het bij pandemische virussen betrekkelijk nieuwe virusvarianten betreft, hebben mensen hiertegen nog geen bescherming op kunnen bouwen door vaccinatie of eerdere infectie. Griep пандеміеën zijn slecht voorspelbaar, maar gaan gepaard met grote gezondheids-, economische- en maatschappelijke gevolgen. Daarom wordt er constant gewerkt aan het ontwikkelen van adequate, tegen de desbetreffende influenzavirussen werkzame, en snel op grote schaal verkrijgbare vaccins. Een belangrijke stap in het ontwikkeltraject van vaccins is het testen op werkzaamheid en veiligheid. Het is van belang dat fabrikanten van vaccins deze testen kunnen laten uitvoeren op een gestandaardiseerde wijze door instellingen die beschikken over gespecialiseerde kennis, zowel wat betreft de te gebruiken modellen als wat betreft de wetenschappelijke achtergronden van influenza. De onderzoekers achter deze aanvraag beschikken in ruime mate over de vereiste expertise.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De instelling heeft een uitgebreide ervaring met het uitvoeren van dit soort testen (in opdracht van

derden) en beschikt over gespecialiseerde kennis m.b.t. de gebruikte diermodellen.

5. Er is geen sprake van de bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De dieren worden gevaccineerd (met toepassing van verschillende vaccinatiestrategieën) en worden vervolgens geïnfecteerd met seizoensinflenzavirussen of 'pandemische' influenzavirussen. Bij het gebruik van laag pathogene virussen ondergaan de dieren maximaal matig ongerief, als gevolg van herhaalde sedatie (ten behoeve van het uitvoeren van de experimentele handelingen) en ziekteverschijnselen als gevolg van de influenza infectie. Bij gebruik van hoog pathogene virussen wordt het ongerief voor (een deel van de dieren) ingeschat op maximaal ernstig, als gevolg van herhaalde sedatie en ziekteverschijnselen. De kans op ernstig ongerief is variabel (0 - 100%) en is afhankelijk van de werkzaamheid van het te testen preparaat. In de negatieve controlegroepen (geen behandeling of behandeling met alleen adjuvans) kan het percentage dieren met ernstig ongerief 100% zijn.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Dit type studie is alleen mogelijk in levende dieren met een intact immuunsysteem. Fretten zijn het kleinst mogelijke diermodel dat geschikt is voor dit type influenzastudies, omdat de klinische verschijnselen na een influenza infectie bij fretten sterke overeenkomsten vertonen met die bij mensen. Die klinische verschijnselen zijn de uitleesmaat van de experimenten waarin wordt onderzocht of de vaccins daadwerkelijk bescherming bieden.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De gewenste groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van reeds beschikbare data. Bovendien wordt voor de challenge/infectie uitsluitend gebruik gemaakt van influenza virussen waarvoor de optimale infectiedosis reeds is vastgesteld. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Op basis van literatuurstudie en de door opdrachtgever verstrekte informatie wordt bekeken of het betreffende

experiment niet al eerder is uitgevoerd.

- 9.** Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Invasieve handelingen worden uitgevoerd onder sedatie en het aantal malen sedatie wordt zoveel mogelijk beperkt. Voldoende is onderbouwd dat voor de beantwoording van de vraagstelling van dit project niet kan worden afgezien van challengestudies. De dieren worden (afhankelijk van de fase waarin de studie zich bevindt) dagelijks danwel vaker (intensiever) geobserveerd. Dieren die het humane eindpunt bereiken worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
- 10.** De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de overwegingen onder bovenstaand punt C (1 t/m 9) komt de commissie tot de volgende ethische afweging.

Influenza epidemieën brengen een hoge ziektelast en veel maatschappelijke kosten met zich mee. Influenza pandemieën vormen een grote bedreiging voor de volksgezondheid en kunnen de samenleving ontwrichten. Daarom is het van belang constant te werken aan het ontwikkelen van adequate vaccins die snel op grote schaal beschikbaar kunnen worden gemaakt. Het is noodzakelijk om (kandidaat) vaccins tijdens het ontwikkeltraject te testen op werkzaamheid en veiligheid. Het is van belang dat deze testen op een gestandaardiseerde wijze worden uitgevoerd door instellingen die beschikken over gespecialiseerde kennis, zowel wat betreft de te gebruiken modellen als wat betreft de wetenschappelijke achtergronden van influenza. De onderzoekers achter deze aanvraag beschikken in ruime mate over die expertise. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. Naar het oordeel van de DEC dient het project dan ook een zeer substantieel belang, omdat het bijdraagt aan de inspanning om griepepidemieën en -pandemieën te beperken of te voorkomen.

Tegenover dit substantiële belang staat het feit dat de dieren in deze experimenten matig, maar in sommige gevallen ook ernstig ongerief zullen ondervinden. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is naar het oordeel van de commissie onvermijdelijk als men de doeleinden wil kunnen realiseren. De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van de dieren.

De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste belang de onvermijdelijke gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

6.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

██████████

Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD905002015142

Bijlagen

2

Datum 28 september 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002015142. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 90500
Naam instelling of organisatie: BioXpert BV
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 54838134
Straat en huisnummer: Nistelrooise Baan 3
Postcode en plaats: 5374 RE SCHAIJK
IBAN: NL72RABO0183605888
Tenaamstelling van het rekeningnummer: BioXpert BV

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Viroclinics Biosciences B.V.
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Viroclinics Biosciences B.V.
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Scientific support
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 september 2015
Geplande einddatum: 31 augustus 2020
Titel project: Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten.
Titel niet-technische samenvatting: Het testen van de werkzaamheid van influenza vaccins al dan in combinatie met een adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten.
Naam DEC: [REDACTED]
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:

vergunninghouder

Plaats:

Schaijk

Datum:

10 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD905002015142

Bijlagen

2

Datum 28 september 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

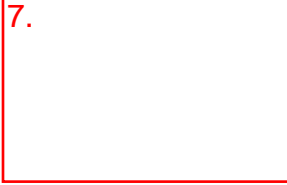
Factuurdatum: 28 september 2015

Vervaldatum: 28 oktober 2015

Factuurnummer: 15700142

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015142	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

██████████
Nistelrooise Baan 3
5374 RE SCHAIJK
|||||

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015142

Datum 21 oktober 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte ██████████

Op 25 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten" met aanvraagnummer AVD905002015142. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

De Niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat enkele tikfouten, zoals 'contant' in plaats van 'constant' en 'accin' in plaats van 'vaccin'. U kunt binnen veertien dagen een nieuwe Niet technische samenvatting sturen. Indien uw aanvraag wordt toegewezen zal de nieuwe Niet technische samenvatting op onze website geplaatst worden, of de bij uw aanvraag ingestuurde versie indien u geen nieuwe Niet technische samenvatting stuurt.

U kunt de Niet technische samenvatting aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum

21 oktober 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD905002015142

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

10.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD905002015142

02 NOV 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 25 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten." met aanvraagnummer AVD905002015142. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten." starten. De vergunning wordt afgegeven van 2 november 2015 tot en met 31 augustus 2020. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie [REDACTED] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 9 september 2015.

Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de

Dierexperimentencommissie. De CCD stelt wel algemene voorwaarden aan dit project. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op


<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
 - DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: BioXpert BV
Adres: Nistelrooise Baan 3
Postcode en plaats: 5374 RE SCHAIJK
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 2 november 2015 tot en met 31 augustus 2020, voor het project "Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten." met aanvraagnummer AVD905002015142, volgens advies van

Dierexperimentencommissie

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Voor de uitvoering van het project is Voorzitter IvD verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 september 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 september 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 oktober 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 september 2015, ontvangen op 25 september 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten.	Fretten (<i>Mustela putorius furo</i>) /	600	Ernstig / severe	Vaccinatiefase en laag-pathogeen: matig; hoog pathogeen en zeldzaam ziektebeeld: ernstig

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In het kader van de humane eindpunten wordt meerdere malen per dag gecontroleerd, in afstemming met de IvD. Dit om te zorgen voor tijdige interventie.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

In alle dierproeven worden mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt, tenzij vanuit regulatorisch oogpunt anders wordt geëist. Zo doende wordt voorkomen dat surplusdieren in voorraad moeten worden gedood.

De aanvrager mag de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten, bij deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand..

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het

project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

Inventaris Wob-verzoek W17-05										
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS nr 2015149	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS Initieel				x	x				
3	Project proposal				x	x		x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven1				x	x		x		
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x		x		
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x	x		x		
7	DEC advies				x		x	x		
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
9	Verzoek aanvullende informatie				x		x	x		
10	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
11	Bijlage dierproeven 1 aangepast				x	x		x		
12	NTS aangepast	x								
13	adviesnota CCD		x							x
14	Beschikking				x	x	x	x		



22 SEP. 2015

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Ja > Vul uw deelnemernummer in 90500 / 1149 Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	BioXpert B.V.
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	54838134
Straat en huisnummer	Nistelrooise Baan 3
Postbus	
Postcode en plaats	5374RE Schaijk
IBAN	NL72RABO0183605888
Tenaamstelling van het rekeningnummer	BioXpert BV

1.3 Vul de gegevens van het postadres in. *Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	Viroclinics Biosciences B.V.	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	Viroclinics Biosciences B.V.	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|--------------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [REDACTED] | |
| Afdeling | Scientific support | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 9 - 2015 |
| Einddatum | 1 - 9 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek naar nieuwe en bevestiging van reeds uitgeteste influenza virussen in fretten.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar infectie met griepvirussen in fretten.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------|
| Naam DEC | [REDACTED] |
| Postadres | [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[REDACTED]
Functie	Vergunninghouder
Plaats	Schaijk
Datum	20 - 9 - 2015
Handtekening	[REDACTED]



BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3
5374 RE Schaijk
The Netherlands
T: +31 (0) 486-463303
F: +31 (0) 486-463498

info@bioxpert.nl
www.bioxpert.nl

Aan: Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Datum: 21 september 2015

Betref: Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD905002015149

Geachte heer / mevrouw,

Bijgaand de getekende aanvraag Projectvergunning Dierproeven AVD905002015149 met als titel:

Onderzoek naar nieuwe en bevestiging van reeds uitgeteste influenza virussen in fretten.

Deze aanvraag is vandaag met de beveiligde e-mailverbinding ingediend.

Met vriendelijke groet,





Format

Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Onderzoek naar infectie met griepvirussen in fretten.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	griep, fretten, infectie, seizoensgriep, pandemie

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project. <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Griepvirussen veroorzaken een grote ziektelast in de mens. Ieder jaar circuleren er in het winterseizoen de influenzavirussen waartegen een groot gedeelte van de bevolking gevaccineerd wordt. Helaas moet deze vaccinatie bijna elk jaar aangepast worden, omdat het virus manieren heeft om bescherming door vaccinatie te omzeilen. Een gedeelte van het voorgestelde project doet onderzoek naar dit fenomeen door te bepalen of circulerende virussen nog voldoende overeenkomen met die gebruikt voor vaccinproductie. Zo niet, dan moet het vaccin aangepast moeten worden. De ontwikkeling van nieuwe vaccins is er onder andere op gericht om deze jaarlijkse afstemming onnodig te maken.</p> <p>Daarnaast is er ook de constante dreiging van een wereldwijde griep pandemie door introductie van nieuwe influenzavarianten vanuit bv. wilde vogels. In dat geval heeft de hele bevolking de kans om geïnfecteerd te raken, aangezien tegen dit soort virussen nog geen afweer in de populatie aanwezig is. Hiertoe is het noodzakelijk dat specifieke vaccins en/of</p>
---	---

medicijnen snel ontwikkeld én getest kunnen worden. Voor het testen van deze middelen moet voor elk uit te testen virus vooraf bepaald worden met welke dosis dieren geïnfecteerd moeten worden om te waarborgen dat de resultaten in het diermodel bruikbaar zijn voor extrapolatie naar de mens.

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Resultaten verkregen in deze studies dragen bij aan de kennis die nodig is voor het jaarlijks aanpassen van de seizoensvaccins tegen griep. Daarnaast zullen de resultaten gebruikt worden om te bepalen met welke dosis van een bepaald griepvirus (nieuw of bestaand) fretten geïnfecteerd moeten worden om onderzoek te doen naar nieuwe vaccinatie of behandelingsmethoden.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- 445 fretten
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- Door infectie met griepvirus kunnen de dieren in meer of mindere mate last krijgen van een longontsteking. In het algemeen zullen de klinische verschijnselen van seizoensgriep minder ongemak (matig) veroorzaken dan die van "pandemische" griep (ernstig).
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?
- Na infectie met seizoensvirussen is het maximale ongemak ingeschaald als matig, na infectie met "pandemische" virussen als ernstig.
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- Aan het eind van de looptijd zullen de dieren gedood worden om:
1. in het bloed de antistoffen te kunnen meten die tegen het griepvirus opgewerkt zijn.
 2. in weefsels te kunnen kijken of de infectie met het griepvirus aan te tonen is en of deze infectie daar ook schade heeft veroorzaakt.

4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.
- Materialen en resultaten verkregen in deze studies kunnen niet gegeneerd worden met proefdiervrije methoden. Daarnaast komen fretten omdat ze geïnfecteerd kunnen worden met klinisch relevante virussen, in aanmerking voor de zogenaamde "animal rule", d.w.z. indien het ethisch niet verantwoord is om iets uit te testen in mensen, resultaten verkregen uit fretten gebruikt kunnen worden voor het vrijgeven van een vaccin of medicijn.
- 4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.
- Resultaten uit het verleden hebben uitgewezen dat de hier voorgestelde experimenten met een zeer beperkt aantal dieren uitgevoerd kunnen worden (■■■■■ dieren per groep).

4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Fretten zijn bevattelijk voor dezelfde griepvirussen als de mens, i.t.t. bijvoorbeeld muizen. Daarnaast lijkt het ziektebeeld in fretten op dat van de mens waardoor ze in aanmerking komen voor de "animal rule" (zie hierboven bij 4.1).

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Fretten zijn bevattelijk voor dezelfde griepvirussen als de mens, i.t.t. bijvoorbeeld muizen. Daarnaast lijkt het ziektebeeld in fretten op dat van de mens waardoor ze in aanmerking komen voor de "animal rule" (zie hierboven bij 4.1).

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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
- 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.

In het kader van vaccin en antiviralen ontwikkeling tegen influenza biedt de aanvrager van dit

projectvoorstel verschillende preklinische modellen aan om deze preparaten uit te testen. Deze modellen worden door de aanvrager opgezet en kunnen vervolgens gebruikt worden om preparaten verschaft door derden (in het algemeen farmaceutische bedrijven) uit te testen. Deze bedrijven maken gebruik van de expertise bij de aanvrager voor het bepalen van het relevante in vivo model (m.b.t. virus dosis en route) om het preparaat uit te testen.

De antigeniciteit van influenza virussen verandert in de tijd significant, een proces beter bekend als antigene drift (Smith, Science, 2004)). Als gevolg hiervan dient het jaarlijkse influenza vaccin regelmatig aangepast te worden om bescherming te kunnen blijven bieden tijdens de elk jaar terugkerende epidemie in de wintermaanden op het noordelijk halfrond als gevolg van deze zogenoemde seizoensvirussen (WHO Avian Influenza Fact Sheet, 2014).

Daarnaast is er een constante dreiging van het uitbreken van een humane influenza pandemie, beter bekend als antigene shift (introdactie van een voor de mens nieuw influenzavirus). Deze pandemieën worden veroorzaakt door influenza virussen die tot dan toe nog niet voorgekomen zijn in de humane populatie en waartegen geen bestaande (of zeer beperkte) immunologische respons bestaat. Als gevolg daarvan ondervinden personen geïnfecteerd met dergelijke pandemische virussen een meer ernstig ziektebeeld resulterend in een hoge mortaliteit. Voor virussen behorend tot beide groepen (seizoens en pandemische virussen) is constant onderzoek nodig om de humane populatie voldoende bescherming te kunnen bieden tegen deze virussen (WHO Influenza Fact Sheet, 2014).

Wereldwijde surveillance en monitoringsprogramma's zijn dan ook van groot belang om zo goed mogelijk voorbereid te blijven op mogelijke pandemische uitbraken, hiertoe werkt de WHO op verschillende platforms samen met de wereldorganisatie voor animal health (OIE) en de voedsel en agricultuur organisatie (FAO). Het Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) houdt de evolutie van circulerende influenzavirussen (de zogenaamde genetische drift en -shift) in de gaten en adviseert jaarlijks wat de samenstelling van de seizoensinflenzavaccins zou moeten zijn voor zowel het noordelijke als het zuidelijke halfrond. Indien als voorbeeld wordt gekeken naar de samenstelling van het seizoensvaccin sinds 2009 zijn een aantal opmerkelijke fenomenen te zien:

- In 2009 was de uitbraak van Mexicaanse griep: dit was gekenmerkt als een pandemie omdat het virus uit de varkenspopulatie was overgesprongen naar de mens (genetische shift). Sindsdien heeft deze Mexicaanse griep, welke van het H1N1 fenotype is, het voorgaande H1N1 verdrongen en is tot op heden onderdeel van het seizoensvaccin (2010 tot heden). Echter in de afgelopen jaren is er geen bijstelling geweest van de H1N1 component van het vaccin, wat aantoont dat de genetische drift van dit H1N1 influenza virus beperkt is.
- Een ander onderdeel van het seizoensvaccin is het H3N2 influenza virus en dit virus heeft sinds 2009 wel een genetische drift laten zien, waarbij deze component van het vaccin in de overgang van 2012 naar 2013, van 2014 naar 2015 en 2015 naar 2016 aangepast is.

Naast het voorkomen van morbiditeit en mortaliteit, heeft de jaarlijkse vaccinatie campagne ook een economisch karakter, aangezien de ziektelast door influenza infecties een hoge belasting kan vormen van de economie (WHO Influenza Fact Sheet, 2014).

In een preklinische setting kan verder onderzoek aan antigene drift en -shift plaatsvinden. Hiertoe wordt in het huidige projectvoorstel onderzocht of antisera geproduceerd in fretten tegen huidige, bekende virussen nog kruisreageren met nieuw circulerende virussen.

Daarnaast spelen dit soort influenza-specifieke antisera ook een cruciale rol in de kwaliteitscontrole van meerdere in vitro serologische assays zoals neutralisatietesten, haemagglutinatietesten, ELISA en Virospot testen. Al deze testen zijn gericht op het aantonen van al dan niet functionele antilichamen specifiek voor influenza in zowel humane als preklinische monsters. De in dit project verkregen antiserum preparaten zullen meegenomen worden als positieve controle tijdens de uitvoering van dergelijke assays. De resultaten zullen vergeleken worden met eerder gegenereerde resultaten om na te gaan of een bepaalde assay goed is uitgevoerd (trending). Maar ook zullen panels van deze antisera gebruikt worden om uitgestuurd te worden naar andere (samenwerkende) laboratoria voor ringtesten (zgn. interlaboratorium kwaliteitsevaluatie).

Tevens zijn vaccin producenten, zowel de big pharma als ook veel kleine bedrijven, bezig met de ontwikkeling van vaccins die nieuwe vaccinatiestrategieën mogelijk maken, zoals vaccins die een bredere herkenning van verschillende influenza virusvarianten induceren waardoor mogelijk jaarlijkse vaccinatie niet meer nodig is (zgn. universele vaccins, zie Jang & Seong, *Viruses*, 2014); of vaccins die beter werken in naïeve individuen (levend geattenuerde of geadjuveerde vaccins, zie Prutsky, *Pediatr Infect Dis J.*, 2014; Del Giudice & Rappuoli, *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2015). Het is aangetoond dat individuen die reeds een immunologische respons hebben tegen influenza, dan wel door vaccinatie dan wel door infectie, een betere immuunrespons geven bij de huidige jaarlijkse vaccinatie (Smith, *PNAS*, 1999). Individuen die nog geen immunologische respons tegen influenza hebben, reageren onvoldoende op de huidige vaccinatie strategie en zijn gebaat bij vaccins die meer immunogeen zijn dan de huidige seizoensvaccins. Daarnaast is er een verschuiving te zien bij de big pharma met betrekking tot de seizoensvaccins. Tot op heden werden vaccins voornamelijk geproduceerd op bebroede kippeneieren, maar in verband met opschaling van de productie (ook in het kader van bijvoorbeeld een snel om zich heen grijpende influenza pandemie) is er een trend naar productie in celkweek. Daarnaast geeft de Wereldgezondheidsorganisatie sinds 2012 naast de samenstelling van het traditionele trivalente seizoensvaccin ook een aanbeveling af voor een uitgebreider, quadrivalent seizoensvaccin (WHO Recommended Composition of influenza virus vaccines).

Dit soort nieuwe vaccinatiestrategieën dienen uitgetest te worden in een relevant diermodel om efficacy aan te tonen. Echter de optimale challenge dosis en challenge route voor deze experimenten dienen vooraf bepaald te worden. Dit laatste is ook het geval bij onderzoek naar vaccinatiestrategieën tegen pandemische virussen. Resultaten verkregen uit dit soort dose-finding studies (in het bijzonder virussen die nieuw geïntroduceerd worden in de humane populatie) zullen zowel beschreven worden in peer-reviewed tijdschriften (o.a. Munster, *Science*, 2009 (pandemisch H1N1); Kreijtz, *Vaccine*, 2013 (H7N9)) en zullen gebruikt worden om een geschikte dosis te selecteren voor het uittesten van antivirale interventie strategieën in fretten. Naast deze dose-finding experimenten komt het ook voor dat een uit te testen virus al eerder uitgetest is in het fretten model. In dat geval zal een dose-confirmation studie uitgevoerd worden. Een dergelijke studie wordt ondernomen indien het voorgaande experiment al langer geleden is uitgevoerd of bijvoorbeeld omdat het uit te testen virus opnieuw is opgegroeid.

De gevonden challenge dosis en route voor zowel seizoens- als pandemische virussen zal ook gebruikt worden om toe te passen in studies waarin onderzoek wordt gedaan naar nieuwe profylactische of therapeutische interventiestrategieën.

De beschreven studies borduren voort op vergelijkbare studies die onze groep eerder heeft uitgevoerd. De verkregen informatie over virus dosis en challenge route werd gebruikt in studies, al dan niet in samenwerking met derden, waarin profylactische en therapeutische interventiestrategieën zijn getest op effectiviteit (

_____)).

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?

De doelstellingen van de afzonderlijke deelprojecten zijn:

1. Bestuderen van de immunologische respons opgewekt tegen een bepaald influenza virus en de kruisreactie van deze immunologische respons tegen afwijkende influenza virussen

Hiertoe worden specifieke antistoffen opgewekt in fretten door infectie met influenzavirussen (primaire uitleesparameter: seroconversie).

De verkregen antisera zullen gebruikt worden voor verschillende doeleinden, namelijk bepalen of antisera geproduceerd in fretten tegen huidige, bekende virussen nog kruis reageren met nieuw circulerende virussen met als doel de noodzaak om het huidige influenza vaccin aan te passen. Daarnaast zullen de antisera gebruikt worden als positieve en trending controle in relevante assay en als materialen om ringtesten uit te voeren.

2. Dose-finding van een nieuw uit te testen influenza virus ten behoeve van gebruik in interventie studies

Hiertoe worden fretten met (nieuwe) influenzavirussen geïnfecteerd (primaire uitleesparameter: virale replicatie). De in deze experimenten gevonden optimale challenge dosis en route zal gebruikt worden in toekomstige profylactische en therapeutische interventie studies tegen nog niet eerder uitgeteste influenza stammen.

3. Dose-confirmation van een reeds uitgetest influenza virus ten behoeve van gebruik in interventie studies.

Hiertoe worden fretten met nieuwe preparaten van reeds uitgeteste influenzavirussen geïnfecteerd (primaire uitleesparameter: virale replicatie). De bevestigde challenge dosis en route gevonden in deze experimenten zal gebruikt worden in toekomstige profylactische en therapeutische interventie studies tegen influenza stammen welke al eerder uitgetest zijn in andere experimenten. Deze dose-confirmation experimenten zullen alleen uitgevoerd worden indien al data beschikbaar zijn van het betreffende virus (met identieke achtergrond van bijvoorbeeld passage geschiedenis) in het betreffende model.

Dit soort studies worden door de aanvrager uitgevoerd om te kunnen voldoen aan de vraag van derden om antivirale interventie strategieën uit te testen en om advies uit te brengen richting regelgevende instanties (o.a. de Wereldgezondheidsorganisatie) over de status van het huidige seizoensvaccin. Vanwege de hoge expertise van de aanvrager op het gebied van influenza en haar relevante in vivo modellen hebben dergelijke studies ook geleid tot publicatie in peer-reviewed tijdschriften. Deze expertise leidt tot een toename van de kwaliteit van het te gebruiken model en het ontwikkeltraject van de betreffende interventie strategie. Daarnaast zullen de materialen verkregen bij doelstelling 1 gebruikt worden bepaalde ringtesten te initiëren. Voor een bepaald aantal assays welke uitgevoerd worden bij de aanvrager is standaardisatie moeilijk vanwege het karakter van de assay: gecompliceerd in uitvoer, aflezen en analyse. Derhalve zijn er geen commerciële reagentia beschikbaar voor het uitvoeren van deze ringtesten en neemt de aanvrager hierin het voortouw.

3.3 Belang

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

Seizoensinfluenza treft jaarlijks tussen de 5% en 10% van de volwassenen en zo'n 20% tot 30% van de kinderen. De ontwikkeling van griep kan resulteren in hospitalisatie en sterfte in met name de zogenaamde risicogroepen (baby's, jonge kinderen, bejaarden en chronisch zieken). Geschat wordt dat de jaarlijkse epidemieën wereldwijd 3 tot 5 miljoen ernstig zieken leidt en tussen de 250.000 en 500.000 sterftegevallen. In ontwikkelde landen vallen de meeste doden bij mensen ouder dan 65 jaar.

Epidemieën kunnen tevens leiden tot absentie van arbeiders en scholieren en daarmee economische schade veroorzaken (WHO Influenza fact sheet, 2014).

Influenza pandemieën (uitbraken die grote delen van de wereld bestrijken vanwege de introductie van een nieuw influenzavirus dat niet eerder in mensen waargenomen is, zoals bv. de Spaanse (1918), Aziatische (1957) en Hongkong (1968) griepandemieën in de vorige eeuw) zijn onvoorspelbaar maar terugkerende gebeurtenissen die wereldwijd grote gezondheids-, economische en maatschappelijke gevolgen hebben. Hiervoor zijn meerdere parallelle factoren betrokken: een (mogelijk) pandemische virus dat in staat is om blijvende mens-op-mens transmissie te bewerkstelligen waarbij het een virus betreft waarvoor geen of nauwelijks immuniteit tegen is opgebouwd in de populatie. Door de wereldwijde toename in handel en reismogelijkheden kan een lokale epidemie snel omslaan naar een infectie op pandemische schaal waarbij weinig tijd beschikbaar is om accurate maatregelen te nemen vanuit het

oogpunt van de volksgezondheid. Recentelijk zijn vogelgriepvirussen A(H5N1) en A(H7N9) geïdentificeerd als zijnde virussen die potentieel een pandemie zouden kunnen veroorzaken, omdat ze blijven circuleren in pluimvee, de meeste mensen geen immuniteit tegen deze stammen hebben en zo dus ernstige ziekte en sterfte kunnen veroorzaken. Daarnaast kan niet uitgesloten worden dat influenzavirussen uit andere bronnen zoals bv. varkens, ook pandemisch potentieel hebben (WHO Avian Influenza fact sheet, 2014).

Wereldwijde surveillance en monitoringsprogramma's zijn dan ook van groot belang om zo goed mogelijk voorbereid te blijven op mogelijke pandemische uitbraken, hiertoe werkt de WHO op verschillende platforms samen met de wereldorganisatie voor animal health (OIE) en de voedsel en landbouw organisatie (FAO). Het Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) houdt de evolutie (de zogenaamde genetische drift en -shift) in de gaten en adviseert jaarlijks wat de samenstelling van de seizoensinflenzavaccins zou moeten zijn voor zowel het noordelijke als het zuidelijke halfrond. Dit netwerk bestaat op dit moment uit ruim 100 nationale influenza centra en vier samenwerkende centra voor referentie en onderzoek waarvoor [REDACTED] veel contract onderzoek doet. Dit netwerk karakteriseert routinematig de antigene eigenschappen van influenza virus waarvoor de antistoffen verkregen in dierproef 1 onontbeerlijk zijn.

Voor zowel vaccinproductie tegen laag pathogene circulerende virussen als voor mogelijk pandemische influenzavirussen, is het van belang om de effectiviteit van het vaccin te testen in een challenge model. Hiervoor dient de optimale infectiedosis van de te gebruiken influenzavirussen bepaald te worden. Voor nieuwe influenzavirussen wordt dit bepaald in dierproef 2, voor een bevestiging van de optimale dosering van nieuwe preparaten van reeds bekende virussen dient dierproef 3.

De resultaten verkregen in de dierproeven beschreven in dit dierproef 2 en 3 voorstel zullen gebruikt worden om nieuw ontwikkelde en misschien beter werkende vaccins te registreren of om de vaccin productie op te schalen indien de snelheid van de uitbraak dit noodzaakt.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

In de studies beschreven in deze proefopzet zullen fretten geïnfecteerd worden met influenza virus ten behoeve van:

1. Ontwikkelen van een antistofpreparaten tegen influenzavirussen.
2. Karakterisatie van nog niet eerder uitgeteste influenzavirussen middels dose-finding studies.
3. Karakterisatie van reeds eerder uitgeteste influenzavirussen middels dose-confirmation studies.

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

1. Ontwikkelen van een antistof respons na infectie met influenza virus

Na een acclimatisatieperiode zal van de dieren onder ketamine sedatie bloed afgenomen worden (pre-monster), waarna de dieren onder ketamine-medetomidine gewogen en geïnfecteerd worden via de intranasale en/of intratracheale route. De werking van medetomidine wordt geantagoneerd met antisedan. Twee weken na de infectie zullen de dieren gewogen en geëuthanaseerd worden onder ketamine-medetomidine sedatie door middel van verbloeden.

NB: eventueel kan besloten worden, indien de replicatie kinetiek van het te gebruiken virus nog onbekend is en benodigd is voor toekomstige efficacy studies, om tijdens de eerste dagen van de infectie fase ook de dieren te bemonsteren uit de luchtwegen (neus en keel). Dit zal per virus bekeken worden en gecommuniceerd worden met de IvD wat het belang en de noodzaak zijn van deze extra bemonstering voor het betreffende virus.

2. Dose-finding van een nog niet uitgetest influenza virus

Na een acclimatisatieperiode zullen alle dieren intraperitoneaal voorzien worden van een data logger onder ketamine-medetomidine sedatie. De werking van medetomidine wordt geantagoneerd met antisedan. Na minimaal twee weken zal van de dieren onder ketamine sedatie bloed en keel en neus monsters afgenomen worden (pre-monster), waarna de dieren onder ketamine-medetomidine geïnfecteerd worden gewogen en via de intranasale en/of intratracheale route. De werking van medetomidine wordt geantagoneerd met antisedan. Dagelijks na infectie zullen de dieren bemonsterd

worden (bloed, neus en keel) onder ketamine sedatie tot en met het moment van euthanasie. Op een bepaald moment na infectie (dag 4, 5 of 7) zullen dieren gewogen en geëuthanaseerd worden onder ketamine-medetomidine sedatie door middel van verbloeden.

3. Dose-confirmation van een reeds uitgetest influenza virus

Hoofdpijnen zijn vergelijkbaar met 2. "Dose-finding", echter worden de dieren hier met een vooraf bepaalde dosis geïnfecteerd zoals gevonden in eerdere studies.

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.

Om goed voorbereid te zijn en te blijven op de epidemische en pandemische dreiging van circulerende en nieuw geïntroduceerde influenzavirussen is het up to date houden van een aantal cruciale reagentia en virusstammen en tevens het onderzoeken van hun eigenschappen van groot belang. Hiertoe dienen de experimenten beschreven in het huidige project.

Voor een (nieuw) influenzavirus waarvoor specifieke antisera niet beschikbaar zijn dient dierproef 1. Hierin worden fretten met het betreffende influenzavirus geïnfecteerd voor het opwekken van een specifiek antiserum dat vervolgens gebruikt kan worden ter verdere karakterisatie van het virus en de bijbehorende immuunrespons. Ook wordt dit serum verspreid over samenwerkende laboratoria om zo wereldwijd bij te dragen aan de zgn. preparedness, de paraatheid tegen de dreiging van influenzavirussen.

Daarnaast is voor het uittesten van potentiële antivirale interventiestrategieën tegen circulerende en nieuw geïntroduceerde influenzavirussen (zoals vaccins, maar ook antivirale middelen, antistofpreparaten, etc.) de optimale infectiedosis van een influenzavirus een belangrijke parameter die bepaald dient te worden, dit gebeurt in dierproef 2.

Indien voor nieuwe batches van bekende influenzavirussen de juiste infectiedosis bevestigd dient te worden, wordt gebruik gemaakt van dierproef 3.

Gezamenlijk wordt met dierproeven 1, 2 en 3 alle benodigde informatie voor het uittesten van de werkzaamheid van antivirale interventiestrategieën tegen (nieuwe) influenzavirussen gegenereerd waardoor de paraatheid ondersteund wordt die vereist is om snel en accuraat te kunnen (blijven) reageren op epidemische en pandemische dreiging ten gevolge van circulerende en nieuw geïntroduceerde influenzavirussen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Antiserum productie na infectie met influenza virus
2	Dose-finding van een nog niet uitgetest influenza virus
3	Dose-confirmation van een reeds uitgetest influenza virus
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u 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.	90500	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	1	Antiserum productie na infectie met influenza virus

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor de productie van antiserum zullen de dieren geïnfecteerd worden via de intranasale en/of intratracheale route. Primaire uitkomstparameter zal seroconversie zijn na infectie. Resultaten uit het verleden hebben aangetoond dat in slechts een enkel geval infectie niet aanslaat en niet zal leiden tot seroconversie.

NB: indien het een nieuw virus betreft waarvan nog geen informatie voorhanden is over de replicatie kinetiek in de luchtwegen kan besloten worden om met een weinig invasieve werkwijze de luchtwegen (neus en keel) te bemonsteren ten behoeve van virologische analyse. Deze bemonstering heeft geen invloed op het ontwikkelen van de immunrespons tegen het virus en dus ook niet op de seroconversie.

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

Na een acclimatisatieperiode van minimaal 7 dagen zullen de dieren onder ketamine-medetomidine sedatie gewogen en geïnfecteerd worden met influenza virus via de intranasale en/of intratracheale route in een volume van respectievelijk 0.3ml en 3ml. De keuze van de route zal afhangen van het te gebruiken virus en indien bekend van de receptor beschikbaarheid van dit virus in de luchtwegen (bovenste en onderste). Zoals beschreven door van Riel et al (AJP 2007) infecteren seizoens virussen voornamelijk de bovenste luchtwegen en in mindere mate de onderste luchtwegen. Pandemische virussen infecteren juist vooral de onderste luchtwegen en laten geen replicatie zien in de bovenste luchtwegen. Op basis van het klinisch beeld van de patiënt waar het isolaat uit afkomstig is kan bepaald worden of men te maken heeft met de eerste of de tweede.

Twee weken na de infectie zullen de dieren gewogen en geëuthanaseerd worden onder ketamine-medetomidine sedatie door middel van verbloeden via hartpunctie. Deze periode tussen infectie en verbloeden is dusdanig gekozen dat het antiserum nog een hoge specificiteit heeft tegen het virus waarmee

geïnficeerd is. Indien voor een later tijdstip gekozen wordt bevat het antiserum een meer bredere specificiteit waardoor bijvoorbeeld typering van virussen op basis van antiserum niet meer mogelijk is. Eerdere bemonstering is niet van toepassing aangezien de hoogte van de immunerespons dan nog te laag is om te gebruiken in de voorgestelde testen.

NB: indien in het uitgevoerde experiment ook de replicatie kinetiek bestudeerd gaat worden, zullen de dieren op dag van infectie (pre-monster) en dagelijks (t/m dag 7) na infectie bemonsterd worden uit de luchtwegen (keel en neus) onder ketamine sedatie. Deze eerste resultaten kunnen gebruikt worden om een eventuele dose-finding (zie dierproef 2) te verfijnen. De keuze om deze bemonstering te beëindigen op dag 7 na infectie is vanwege het feit dat eerder (gepubliceerd) onderzoek heeft aangetoond dat de piek van de virale replicatie binnen deze eerste 7 dagen zal plaatsvinden.

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

In principe zullen per virus [REDACTED] dieren geïnficeerd worden om het antiserum op te wekken. De jarenlange ervaring van het Nederlands Influenza Centrum (NIC) welke ondergebracht is bij de afdeling Viroscience van het Erasmus MC, heeft geleerd dat de opbrengst van [REDACTED] dieren per isolaat voldoende is voor het uitvoeren van de gewenste testen. Maatstaf zal hier zijn dat het bloedvolume ongeveer 7-8% van het lichaamsgewicht is en dat bij opwerken ongeveer 40% van het bloedvolume uit serum zal bestaan. Voor een mannelijke fret van 800 gram zal dit dus een serum volume van 20-25ml zijn.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoort: fretten (mannelijk) van 6-18 maanden.

De fret is zeer gevoelig voor infectie met wild-type (niet laboratorium-geadapteerde en klinisch relevante) influenza virussen. Daarom worden fretten al jaren gebruikt voor het maken van influenza-specifiek antiserum. Vanwege het hogere lichaamsgewicht en dus ook bloedvolume wordt altijd gebruik gemaakt van mannelijke fretten.

Herkomst: geregistreerde leverancier in de EU

Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt.

Geschatte aantal: [REDACTED] dieren in 5 jaar

Er wordt verwacht om per jaar voor 10 verschillende influenza virussen antiserum op te wekken. Per jaar circuleren er 4 verschillende influenza virussen (1x H1N1, 1x H3N2 en 2xB) en de verwachting is om per jaar voor minimaal elk virus antiserum op te wekken tegen een drift variant (mogelijk afwijkende virus variant). Daarnaast ligt het in de verwachting om per jaar ook antiserum op te wekken tegen 2 "emerging influenza viruses".

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: de dierproeven die vallen onder dit project zijn opgezet ter productie van antiserum tegen influenza virus. Dit is in vitro niet na te bootsen. Aangezien fretten te infecteren zijn met wild-type virussen in tegenstelling tot muizen die over het algemeen alleen te infecteren zijn met muis-geadapteerde influenza virussen, is dit het kleinst mogelijke en meest relevante model om antiserum te produceren.

Vermindering: de benodigde hoeveelheid antiserum is leidend in deze experimenten. Er wordt altijd gebruik gemaakt van mannelijke fretten, omdat mannelijke fretten een hoger lichaamsgewicht hebben en dus een groter bloedvolume.

Verfijning: Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder anesthesie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven zullen de dieren frequenter geobserveerd worden en daarnaast zullen ze indien dit nodig is vanuit welzijnsstandpunt ook vaker gewogen worden. De hoogte van intensivering is mede bepaald door fase waarin de studie zich bevindt. Tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van influenza een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

Tevens kan besloten worden, indien het een nieuw virus betreft waarvan nog geen informatie voorhanden is over de replicatie kinetiek in de luchtwegen, om met een weinig invasieve werkwijze de luchtwegen (neus en keel) te bemonsteren ten behoeve van virologische analyse tijdens de eerste fase van de infectie. Deze bemonstering heeft geen invloed op het ontwikkelen van de immunrespons tegen het virus en dus ook niet op de seroconversie. Met deze eerste resultaten kunnen vervolgens dose-finding experimenten beter geoptimaliseerd worden wat betreft bijvoorbeeld challenge condities of opvolgtijd na infectie wat kan leiden tot verfijning en vermindering in vervolg experimenten.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

In het algemeen hebben analgetica een ontstekingsremmende werking en dergelijke bijverschijnselen zijn niet verenigbaar met een dierproef waarin het opwekken van een ontsteking (bijvoorbeeld een immuunrespons t.g.v. een infectie) een belangrijke rol speelt (in dit geval de productie van antilichamen).

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Agressie binnen de groep

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Verandering van leefomgeving (bv verhuizing van standaard groepshuisvesting naar klasse III inperking) of gebruik van dieren die niet eerder samen gehuisvest waren.

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

Er zal kooiverrijking aangeboden worden welke geen gevaar oplevert voor de medewerkers indien dieren onder klasse III inperking gehuisvest worden. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan schuilmogelijkheden welke het uitvangen van de dieren bemoeilijken met bijt-accidenten als gevolg. Daarnaast is de leverancier van fretten dusdanig uitgekozen dat agressie niet of nauwelijks een rol speelt in deze dieren.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Infecties met influenza virus kunnen leiden tot ernstige ziekte gekenmerkt door: respiratoire problemen, neurologische verschijnselen, diarree, dyspnoe, afwezigheid van eetlust, lethargie en gewichtsverlies van >20%. Na infectie zullen de dieren uitvoerig gevolgd worden voor het detecteren van deze verschijnselen. Aangezien het ongerief en de desbetreffende humane eindpunten afhankelijk zijn van het gekozen virus, zijn deze hieronder uitgesplitst naar infectie met laag en hoog pathogeen influenza virus. Tevens zijn twee criteria toegevoegd waarbij dieren direct geëuthanaseerd zullen worden en die onafhankelijk zijn van het gekozen virus (laag of hoog pathogeen). Bij het vertonen van een van de volgende humane eindpunten zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

Laag pathogeen influenza virus:

- Gewichtsverlies: tijdens de infectie fase worden de dieren dagelijks gewogen. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier 10% of meer gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van infectie (althoewel de middelen daartoe erg beperkt zijn, kan ook bekeken worden tijdens de infectie fase of een betreffend dier solitair gehuisvest kan worden).

NB: Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een

verhoogde ademhalingsfrequentie. Aangezien deze verhoogde ademhaling frequentie niet wordt beschouwd als hoger ongerief dan dat wordt veroorzaakt door herhaalde bemonstering (matig), is dit geen humaan eindpunt bij laag pathogene virussen.

Hoog pathogeen influenza virus:

- Gewichtsverlies: tijdens de infectie fase worden de dieren dagelijks gewogen. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier 20% of meer gewicht verliest (geclassificeerd als ernstig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van infectie (althoewel de middelen daartoe erg beperkt zijn, kan ook bekeken worden tijdens de infectie fase of een betreffend dier solitair gehuisvest kan worden).
- Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van een verhoogde ademhalingsfrequentie (matig ongerief) naar moeizaam ademen (ernstig ongerief) of zelfs een stokkende ademhaling (dyspnoe). De moeizame ademhaling is te zien aan het meedoen van de flanken van het dier bij het ademen. Daarnaast kan het zo zijn dat het betreffende dier niet meer bij de andere dieren (opgerold) ligt, maar juist apart gaat liggen en gestrekt om het ademen te vergemakkelijken.
- Diarree: indien in de huisvesting te zien is dat een of meerdere dieren diarree (geclassificeerd als matig) hebben, zullen alle dieren afzonderlijk beoordeeld worden om te bepalen of er aanwijzingen zijn (vuile vacht rond de anus) welke dieren daadwerkelijk diarree vertonen.

Laag of hoog pathogeen virus:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (beide geclassificeerd als ernstig ongerief):

- Neurologisch: in enkele gevallen kan het virus vanuit de neus van het dier doorslaan naar de hersenen en zo een ontsteking van de hersenen induceren. De daarbij behorende verschijnselen zijn onstabiele gang en ongecontroleerde bewegingen (zoals beschreven in Bodewes et al 2015 AJP).
- Lethargie: indien een dier lethargisch is (maw als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

Het verloop van klinische verschijnselen zal afhankelijk zijn van het gekozen influenza virus (laag of hoog pathogeen) en zal derhalve hieronder uitgesplitst worden:

In het geval van laag pathogene (seizoens)influenzavirussen is de kans hierop heel klein, $\leq 5\%$ (het waarnemingspercentage in eigen experimenten in het verleden is 0%).

In het geval van hoog pathogene ("emerging", pandemische, aviaire) influenzavirussen is de kans hierop variabel, afhankelijk van virulentie en dosis van het te gebruiken virus: 0 - 100%. Hieronder ter verduidelijking een figuur met data uit een vergelijkbare studie met dit soort influenzavirussen (██████████).

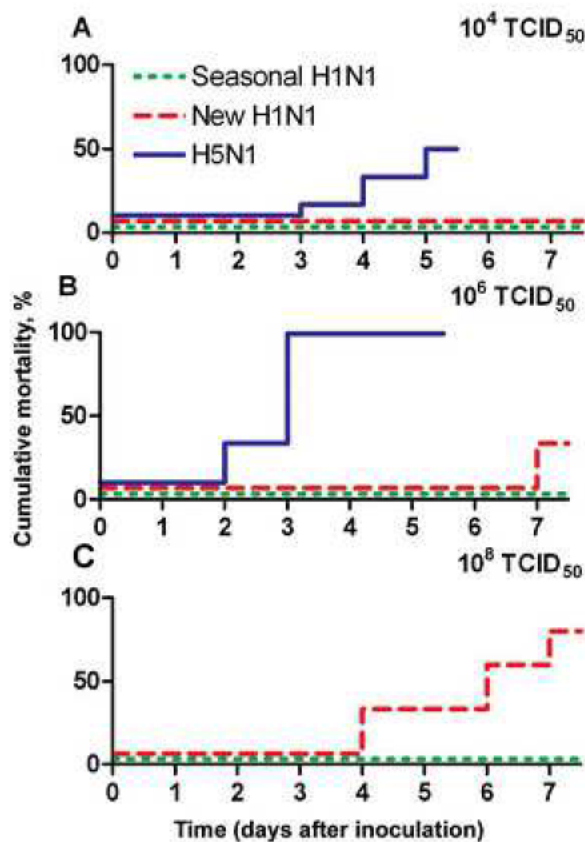


Figure 1. Cumulative mortality rates of ferrets inoculated with different influenza viruses. Ferrets were intratracheally inoculated with seasonal H1N1 ($n = 3$), new H1N1 ($n = 6$), or highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 ($n = 6$) influenza viruses at a dose of 10^4 (A), 10^6 (B), or 10^8 (C) median tissue culture infective dose (TCID₅₀). Cumulative mortality for new H1N1 virus was intermediate between that for seasonal H1N1 virus and that for HPAI H5N1 virus.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op matig voor laag pathogene seizoens influenza virussen en ernstig voor hoog pathogene (mogelijk pandemische) influenza virussen.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De gemiddelde benodigde hoeveelheid antiserum is niet te verkrijgen door bloedafname, maar dient te gebeuren door middel van verbloeden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u 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.	90500	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	2	Dose-finding van een nog niet uitgetest influenza virus

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De hier beschreven experimenten hebben als doel om de infectie dosis te bepalen van een nieuw/nog niet uitgetest influenza virus in fretten. Deze infectie dosis kan vervolgens gebruikt worden in opvolgende profylactische of therapeutische interventie studies tegen influenza. Hiervoor zullen dieren, welke voorzien zijn van een datalogger voor temperatuur metingen, geïnfecteerd worden met verschillende doses (in het algemeen 3 verschillende doses) van het uit te testen virus en zullen tijdens de looptijd van het experiment monsters uit de luchtwegen verzameld worden om de replicatie kinetiek te bepalen. Op het eindpunt van het experiment zullen de dieren geëuthanaseerd worden voor zowel pathologie als virologie op respiratoire (en indien van toepassing andere) weefsels.

De primaire uitkomst parameter zal afhankelijk zijn van het uit te testen virus, maar zal in het algemeen virale replicatie zijn in het voorspelde gedeelte van de luchtwegen.

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

Na een acclimatisatieperiode van minimaal 7 dagen zullen de dieren onder ketamine-medetomidine sedatie worden voorzien van een intraperitoneale datalogger. Na deze operatie zal er een periode van herstel zijn van minimaal twee weken, waarna ze gewogen en geïnfecteerd worden met influenza virus via de intranasale en/of intratracheale route in een volume van 0.3ml (intranasaal) en 3ml (intratracheaal) waarbij de dosis van het virus in deze volumina afhangt van het betreffende virus (deze dosis zal beargumenteerd worden in het betreffende werkprotocol). De keuze van de route zal afhangen van het te gebruiken virus en indien bekend van de receptor beschikbaarheid van dit virus in de luchtwegen (bovenste en onderste). Zoals beschreven door van Riel et al (AJP 2007) infecteren seizoens virussen voornamelijk de bovenste luchtwegen en in mindere mate de onderste luchtwegen. Pandemische virussen infecteren juist vooral de onderste luchtwegen en laten geen replicatie zien in de bovenste luchtwegen. Op basis van het klinisch

beeld van de patiënt waar het isolaat uit afkomstig is kan bepaald worden of men te maken heeft met de eerste of de tweede.

Op de dag van infectie (pre-monster) en dagelijks na infectie zullen de dieren gewogen en bemonsterd worden uit de luchtwegen (keel en neus) onder ketamine sedatie tot en met de dag van euthanasie waarbij de dieren verbloed worden onder ketamine-medetomidine sedatie via hartpunctie. De dag van euthanasie zal bepaald worden aan de hand van de voorhanden zijnde (klinische) informatie over het betreffende virus of informatie over vergelijkbare virussen: laag pathogene seizoens influenza virussen op dag 4 na infectie en hoog pathogene (mogelijk pandemische) influenza virussen op dag 5 na infectie.

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

Per dosis zullen [] dieren geïnfecteerd worden. Aangezien bij een dose-finding de verschillende groepen met elkaar vergeleken kunnen worden, is het mogelijk om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren. Daarnaast hebben eerdere dose-finding experimenten (niet gepubliceerd) en de ervaring opgedaan in deze eerdere experimenten laten zien dat met dergelijke kleine groepen een goed onderbouwde keuze gemaakt kan worden over de dosis van het betreffende virus.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoort: fretten (mannelijk of vrouwelijk) van 6-18 maanden.

De fret is zeer gevoelig voor infectie met wild-type (niet laboratorium-geadapteerde en klinisch relevante) influenza virussen. Daarom worden fretten al jaren gebruikt voor het maken van influenza-specifiek antiserum, maar ook voor profylactische en therapeutische interventie studies. Tevens is door de FDA bepaald dat het fretten model in aanmerking komt voor de "animal rule", wat erop neer komt dat indien het ethisch niet verantwoord is om een efficacy experiment uit te voeren in mensen, resultaten verkregen in een relevant diermodel gebruikt kunnen worden voor de licentie van een product. Het ziektebeeld na infectie met influenza virus is niet verschillend tussen mannelijke of vrouwelijke fretten.

Herkomst: geregistreerde leverancier in de EU

Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt.

Geschatte aantal: [] dieren in 5 jaar

Er wordt verwacht om per jaar voor 6 verschillende influenza virussen een dose-finding experiment uit te voeren. Per jaar circuleren er 4 verschillende influenza virussen (1x H1N1, 1x H3N2 en 2xB) en daarnaast ligt het in de verwachting om per jaar ook 2 "emerging influenza viruses". Indien per virus [] verschillende dosis uitgetest worden in [] dieren per dosis komt dat uit op een totaal van [] = [] dieren per jaar en [] dieren in 5 jaar.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: de dierproeven die vallen onder dit project zijn opgezet voor het bepalen van een infectie dosis met influenza virus ten behoeve van toekomstige efficacy experimenten. Dit is in vitro niet na te bootsen. Aangezien fretten te infecteren zijn met wild-type virussen in tegenstelling tot muizen die over het algemeen alleen te infecteren zijn met muis-geadapteerde influenza virussen, is dit het kleinst mogelijke en

meest relevante model om influenza infecties te bestuderen.

Vermindering: kennis uit het verleden is leidend voor de groepsgrootte (namelijk ■ dieren per dosis) in deze experimenten. Indien additionele informatie voorhanden is over het betreffende uit te testen virus (bijvoorbeeld infectie experimenten door een andere instelling met een virus met identieke achtergrond) kan besloten worden om voor het betreffende virus niet een dose-finding, maar slechts een dose-confirmation (zie dierproef 3) uit te voeren wat een vermindering geeft van 6 dieren voor dat betreffende virus.

Verfijning: Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder anesthesie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven zullen de dieren frequenter geobserveerd worden en daarnaast zullen ze indien dit nodig is vanuit welzijnsstandpunt ook vaker gewogen worden. De hoogte van intensivering is mede bepaald door fase waarin de studie zich bevindt. Tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van influenza een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

In het algemeen hebben analgetica een ontstekingsremmende werking en dergelijke bijverschijnselen zijn niet verenigbaar met een dierproef waarin het opwekken van een ontsteking (bijvoorbeeld een immuunrespons t.g.v. een infectie) een belangrijke rol speelt (in dit geval de productie van antilichamen).

NB: bij het implanteren van de temperatuurlogger in de peritoneale holte zullen de dieren wel degelijk pijnstilling krijgen. Dit is mede gerechtvaardigd aangezien de relatief kortdurende werking van de pijnstilling op minimaal 14 dagen voor start geen invloed heeft op het betreffende experiment.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Agressie binnen de groep

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Verandering van leefomgeving (bv verhuizing van standaard groepshuisvesting naar klasse III inperking) of gebruik van dieren die niet eerder samen gehuisvest waren.

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

Er zal kooiverrijking aangeboden worden welke geen gevaar oplevert voor de medewerkers indien dieren onder klasse III inperking gehuisvest worden. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan schuilmogelijkheden welke het uitvangen van de dieren bemoeilijken met bijt-accidenten als gevolg. Daarnaast is de leverancier van fretten dusdanig uitgekozen dat agressie niet of nauwelijks een rol speelt in deze dieren.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Infecties met influenza virus kunnen leiden tot ernstige ziekte gekenmerkt door: respiratoire problemen, neurologische verschijnselen, diarree, dyspnoe, afwezigheid van eetlust, lethargie en gewichtsverlies van >20%. Na infectie zullen de dieren uitvoerig gevolgd worden voor het detecteren van deze verschijnselen. Aangezien het ongerief en de desbetreffende humane eindpunten afhankelijk zijn van het gekozen virus, zijn deze hieronder uitgesplitst naar infectie met laag en hoog pathogeen influenza virus. Tevens zijn twee criteria toegevoegd waarbij dieren direct geëuthanaseerd zullen worden en die onafhankelijk zijn van het gekozen virus (laag of hoog pathogeen). Bij het vertonen van een van de volgende humane eindpunten zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

Laag pathogeen influenza virus:

- Gewichtsverlies: tijdens de infectie fase worden de dieren dagelijks gewogen. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier 10% of meer gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van infectie (althoewel de middelen daartoe erg beperkt zijn, kan ook bekeken worden tijdens de infectie fase of een betreffend dier solitair gehuisvest kan worden).

NB: Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie. Aangezien deze verhoogde ademhaling frequentie niet wordt beschouwd als hoger ongerief dan dat wordt veroorzaakt door herhaalde bemonstering (matig), is dit geen humaan eindpunt bij laag pathogene virussen.

Hoog pathogeen influenza virus:

- Gewichtsverlies: tijdens de infectie fase worden de dieren dagelijks gewogen. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier 20% of meer gewicht verliest (geclassificeerd als ernstig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van infectie (alhoewel de middelen daartoe erg beperkt zijn, kan ook bekeken worden tijdens de infectie fase of een betreffend dier solitair gehuisvest kan worden).
- Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van een verhoogde ademhalingsfrequentie (matig ongerief) naar moeizaam ademen (ernstig ongerief) of zelfs een stokkende ademhaling (dyspnoe). De moeizame ademhaling is te zien aan het meedoen van de flanken van het dier bij het ademen. Daarnaast kan het zo zijn dat het betreffende dier niet meer bij de andere dieren (opgerold) ligt, maar juist apart gaat liggen en gestrekt om het ademen te vergemakkelijken.
- Diarree: indien in de huisvesting te zien is dat een of meerdere dieren diarree (geclassificeerd als matig) hebben, zullen alle dieren afzonderlijk beoordeeld worden om te bepalen of er aanwijzingen zijn (vuile vacht rond de anus) welke dieren daadwerkelijk diarree vertonen.

Laag of hoog pathogeen virus:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (beide geclassificeerd als ernstig ongerief):

- Neurologisch: in enkele gevallen kan het virus vanuit de neus van het dier doorslaan naar de hersenen en zo een ontsteking van de hersenen induceren. De daarbij behorende verschijnselen zijn onstabiele gang en ongecontroleerde bewegingen (zoals beschreven in [REDACTED]).
- Lethargie: indien een dier lethargisch is (maw als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

Het verloop van klinische verschijnselen zal afhankelijk zijn van het gekozen influenza virus (laag of hoog pathogeen) en zal derhalve hieronder uitgesplitst worden:

In het geval van laag pathogene (seizoens)influenzavirussen is de kans hierop heel klein, $\leq 5\%$ (het waarnemingspercentage in eigen experimenten in het verleden is 0%).

In het geval van hoog pathogene ("emerging", pandemische, aviaire) influenzavirussen is de kans hierop variabel, afhankelijk van virulentie en dosis van het te gebruiken virus: 0 - 100%. Hieronder ter verduidelijking een figuur met data uit een vergelijkbare studie met dit soort influenzavirussen ([REDACTED]).

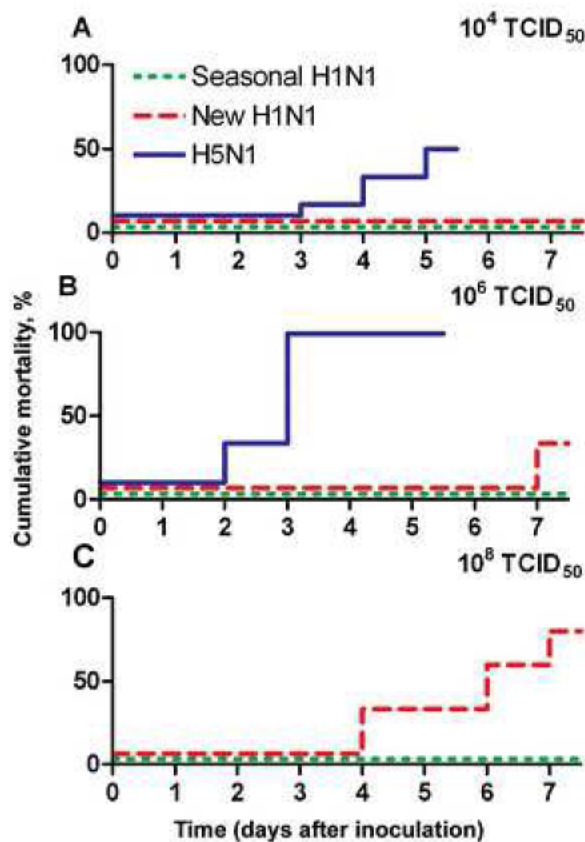


Figure 1. Cumulative mortality rates of ferrets inoculated with different influenza viruses. Ferrets were intratracheally inoculated with seasonal H1N1 ($n = 3$), new H1N1 ($n = 6$), or highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 ($n = 6$) influenza viruses at a dose of 10^4 (A), 10^6 (B), or 10^8 (C) median tissue culture infective dose (TCID₅₀). Cumulative mortality for new H1N1 virus was intermediate between that for seasonal H1N1 virus and that for HPAI H5N1 virus.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op matig voor laag pathogene seizoens influenza virussen en ernstig voor hoog pathogene (mogelijk pandemische) influenza virussen.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Dieren zullen worden gedood om vervolgens de virale load en pathologie in de longen te bestuderen. Deze bepaling is niet mogelijk bij het in leven blijven van de dieren.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u 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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 3 | Dose-confirmation van een reeds uitgetest influenza virus |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De hier beschreven experimenten hebben als doel om de infectie dosis te bevestigen van een reeds eerder uitgetest influenza virus in fretten. Deze experimenten kunnen nodig zijn vanwege de lange tijdsduur tussen de verschillende experimenten (>2 jaar), het feit dat een nieuwe batch virus is opgegroeid of informatie verkregen van derden (dit kan het uittesten zijn van het betreffende virus met dezelfde achtergrond in het fretten model). Deze infectie dosis kan vervolgens gebruikt worden in opvolgende profylactische of therapeutische interventie studies tegen influenza. Hiervoor zullen dieren, welke voorzien zijn van een datalogger voor temperatuur metingen, geïnfecteerd worden met de eerder bepaalde infectie dosis van het uit te testen virus en zullen tijdens de looptijd van het experiment monsters verzameld worden om de replicatie kinetiek te bevestigen. Op het eindpunt van het experiment zullen de dieren geëuthanaseerd worden voor zowel pathologie als virologie op respiratoire (en indien van toepassing andere) weefsels. De primaire uitkomst parameter zal overeenkomst zijn met eerder gevonden resultaten voor het betreffende virus.

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

Na een acclimatisatieperiode van minimaal 7 dagen zullen de dieren onder ketamine-medetomidine sedatie worden voorzien van een intraperitoneale datalogger. Na deze operatie zal er een periode van herstel zijn van minimaal twee weken, waarna ze gewogen en geïnfecteerd worden met influenza virus via de intranasale en/of intratracheale route in een volume van 0.3 ml (intranasaal) en 3ml (intratracheaal) waarbij de dosis van het virus in deze volumina afhangt van het betreffende virus (deze dosis zal beargumenteerd worden in het betreffende werkprotocol). De keuze van de route zal afhangen van het te gebruiken virus en indien bekend van de receptor beschikbaarheid van dit virus in de luchtwegen (bovenste en onderste). Zoals beschreven door ██████████ infecteren seizoens virussen voornamelijk de

bovenste luchtwegen en in mindere mate de onderste luchtwegen. Pandemische virussen infecteren juist vooral de onderste luchtwegen en laten geen replicatie zien in de bovenste luchtwegen. Op basis van het klinisch beeld van de patiënt waar het isolaat uit afkomstig is kan bepaald worden of men te maken heeft met de eerste of de tweede.

Op de dag van infectie (pre-monster) en dagelijks na infectie zullen de dieren gewogen en bemonsterd worden uit de luchtwegen (keel en neus) onder ketamine sedatie tot en met de dag van euthanasie waarbij de dieren verbleed worden onder ketamine-medetomidine sedatie via hartpunctie. De dag van euthanasie zal bepaald worden aan de hand van eerder verkregen informatie over het betreffende virus.

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

Per virus zullen ■■■ dieren geïnfecteerd worden. Aangezien resultaten verkregen in deze experimenten vergeleken worden met eerdere resultaten, is het mogelijk om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren. Daarnaast hebben eerdere dose-confirmation experimenten (niet gepubliceerd) en de ervaring opgedaan in deze eerdere experimenten laten zien dat met dergelijke kleine aantallen dieren een goed vergelijk kan worden gemaakt met eerdere resultaten. Indien resultaten dusdanig afwijken van eerdere resultaten kan besloten worden om het betreffende virus uit te testen in een dose-finding experiment (zie beschrijving dierproef 2).

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoort: fretten (mannelijk of vrouwelijk) van 6-18 maanden.

De fret is zeer gevoelig voor infectie met wild-type (niet laboratorium-geadapteerde en klinisch relevante) influenza virussen. Daarom worden fretten al jaren gebruikt voor het maken van influenza-specifiek antiserum, maar ook voor profylactische en therapeutische interventie studies. Tevens is door de FDA bepaald dat het fretten model in aanmerking komt voor de "animal rule", wat erop neer komt dat indien het ethisch niet verantwoord is om een efficacy experiment uit te voeren in mensen, resultaten verkregen in een relevant diermodel gebruikt kunnen worden voor de licentie van een product. Het ziektebeeld na infectie met influenza virus is niet verschillend tussen mannelijke of vrouwelijke fretten.

Herkomst: geregistreerde leverancier in de EU

Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt.

Geschatte aantal: ■■■ dieren in 5 jaar

Er wordt verwacht om per jaar voor 5 verschillende influenza virussen een dose-confirmation experiment uit te voeren. Indien per virus ■■ dieren gebruikt worden komt dat uit op een totaal van ■■■■ dieren per jaar en ■■■■ dieren in 5 jaar.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: de dierproeven die vallen onder dit project zijn opgezet voor het bepalen van een infectie dosis met influenza virus ten behoeve van toekomstige efficacy experimenten. Dit is in vitro niet na te bootsen. Aangezien fretten te infecteren zijn met wild-type virussen in tegenstelling tot muizen die over het algemeen alleen te infecteren zijn met muis-geadapteerde influenza virussen, is dit het kleinst mogelijke en

meest relevante model om influenza infecties te bestuderen.

Vermindering: kennis uit het verleden is leidend voor de groepsgrootte (namelijk ■ dieren per virus) in deze experimenten. Met deze methode kan in een beperkt aantal dieren bepaald worden of de infectie dosis in een over het algemeen veel groter interventie experiment juist is.

Verfijning: Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder anesthesie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven zullen de dieren frequenter geobserveerd worden en daarnaast zullen ze indien dit nodig is vanuit welzijnsstandpunt ook vaker gewogen worden. De hoogte van intensivering is mede bepaald door fase waarin de studie zich bevindt. Tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van influenza een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

In het algemeen hebben analgetica een ontstekingsremmende werking en dergelijke bijverschijnselen zijn niet verenigbaar met een dierproef waarin het opwekken van een ontsteking (bijvoorbeeld een immuunrespons t.g.v. een infectie) een belangrijke rol speelt (in dit geval de productie van antilichamen).

NB: bij het implanteren van de temperatuurlogger in de peritoneale holte zullen de dieren wel degelijk pijnstilling krijgen. Dit is mede gerechtvaardigd aangezien de relatief kortdurende werking van de pijnstilling op minimaal 14 dagen voor start geen invloed heeft op het betreffende experiment.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Agressie binnen de groep

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Verandering van leefomgeving (bv verhuizing van standaard groepshuisvesting naar klasse III inperking) of gebruik van dieren die niet eerder samen gehuisvest waren.

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

Er zal kooiverrijking aangeboden worden welke geen gevaar oplevert voor de medewerkers indien dieren onder klasse III inperking gehuisvest worden. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan schuilmogelijkheden welke het uitvangen van de dieren bemoeilijken met bijt-accidenten als gevolg. Daarnaast is de leverancier van fretten dusdanig uitgekozen dat agressie niet of nauwelijks een rol speelt in deze dieren.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Infecties met influenza virus kunnen leiden tot ernstige ziekte gekenmerkt door: respiratoire problemen, neurologische verschijnselen, diarree, dyspnoe, afwezigheid van eetlust, lethargie en gewichtsverlies van >20%. Na infectie zullen de dieren uitvoerig gevolgd worden voor het detecteren van deze verschijnselen. Aangezien het ongerief en de desbetreffende humane eindpunten afhankelijk zijn van het gekozen virus, zijn deze hieronder uitgesplitst naar infectie met laag en hoog pathogeen influenza virus. Tevens zijn twee criteria toegevoegd waarbij dieren direct geëuthanaseerd zullen worden en die onafhankelijk zijn van het gekozen virus (laag of hoog pathogeen). Bij het vertonen van een van de volgende humane eindpunten zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

Laag pathogeen influenza virus:

- Gewichtsverlies: tijdens de infectie fase worden de dieren dagelijks gewogen. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier 10% of meer gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van infectie (althoewel de middelen daartoe erg beperkt zijn, kan ook bekeken worden tijdens de infectie fase of een betreffend dier solitair gehuisvest kan worden).

NB: Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie. Aangezien deze verhoogde ademhaling frequentie niet wordt

beschouwd als hoger ongerief dan dat wordt veroorzaakt door herhaalde bemonstering (matig), is dit geen humaan eindpunt bij laag pathogene virussen.

Hoog pathogeen influenza virus:

- Gewichtsverlies: tijdens de infectie fase worden de dieren dagelijks gewogen. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier 20% of meer gewicht verliest (geclassificeerd als ernstig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van infectie (alhoewel de middelen daartoe erg beperkt zijn, kan ook bekeken worden tijdens de infectie fase of een betreffend dier solitair gehuisvest kan worden).
- Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van een verhoogde ademhalingsfrequentie (matig ongerief) naar moeizaam ademen (ernstig ongerief) of zelfs een stokkende ademhaling (dyspnoe). De moeizame ademhaling is te zien aan het meedoen van de flanken van het dier bij het ademen. Daarnaast kan het zo zijn dat het betreffende dier niet meer bij de andere dieren (opgerold) ligt, maar juist apart gaat liggen en gestrekt om het ademen te vergemakkelijken.
- Diarree: indien in de huisvesting te zien is dat een of meerdere dieren diarree (geclassificeerd als matig) hebben, zullen alle dieren afzonderlijk beoordeeld worden om te bepalen of er aanwijzingen zijn (vuile vacht rond de anus) welke dieren daadwerkelijk diarree vertonen.

Laag of hoog pathogeen virus:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (beide geclassificeerd als ernstig ongerief):

- Neurologisch: in enkele gevallen kan het virus vanuit de neus van het dier doorslaan naar de hersenen en zo een ontsteking van de hersenen induceren. De daarbij behorende verschijnselen zijn onstabiele gang en ongecontroleerde bewegingen (zoals beschreven in Bodewes et al 2015 AJP).
- Lethargie: indien een dier lethargisch is (maw als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

Het verloop van klinische verschijnselen zal afhankelijk zijn van het gekozen influenza virus (laag of hoog pathogeen) en zal derhalve hieronder uitgesplitst worden:

In het geval van laag pathogene (seizoens)influenzavirussen is de kans hierop heel klein, $\leq 5\%$ (het waarnemingspercentage in eigen experimenten in het verleden is 0%).

In het geval van hoog pathogene ("emerging", pandemische, aviaire) influenzavirussen is de kans hierop variabel, afhankelijk van virulentie en dosis van het te gebruiken virus: 0 - 100%. Hieronder ter verduidelijking een figuur met data uit een vergelijkbare studie met dit soort influenzavirussen (██████████).
██████████).

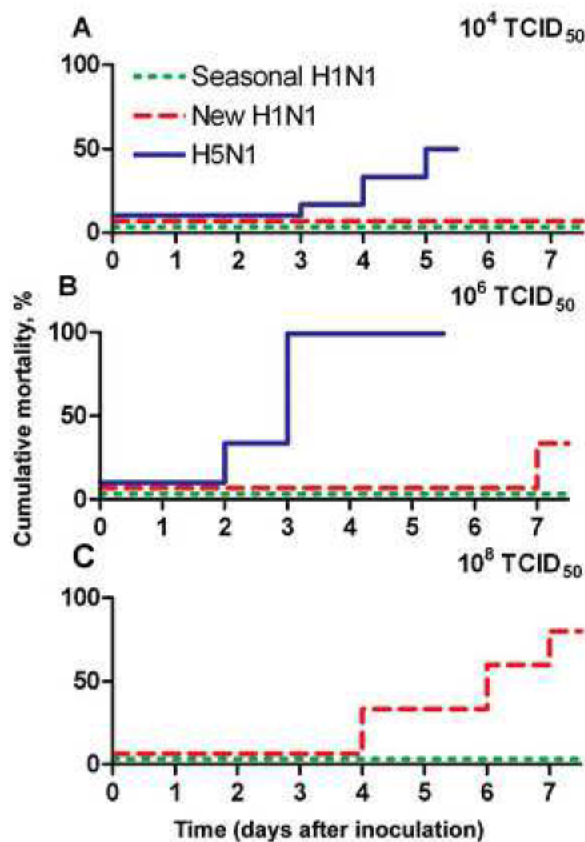


Figure 1. Cumulative mortality rates of ferrets inoculated with different influenza viruses. Ferrets were intratracheally inoculated with seasonal H1N1 ($n = 3$), new H1N1 ($n = 6$), or highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 ($n = 6$) influenza viruses at a dose of 10^4 (A), 10^6 (B), or 10^8 (C) median tissue culture infective dose (TCID₅₀). Cumulative mortality for new H1N1 virus was intermediate between that for seasonal H1N1 virus and that for HPAI H5N1 virus.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op matig voor laag pathogene seizoens influenza virussen en ernstig voor hoog pathogene (mogelijk pandemische) influenza virussen.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Dieren zullen worden gedood om vervolgens de virale load en pathologie in de longen te bestuderen. Deze bepaling is niet mogelijk bij het in leven blijven van de dieren.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD905002015149
2. Titel van het project: Onderzoek naar nieuwe en bevestiging van reeds uitgeteste influenza virussen in fretten.
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar infectie met griepvirussen in fretten.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC
 - naam DEC: ██████████
 - telefoonnummer contactpersoon ██████████
 - mailadres contactpersoon: ██
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC 25 juni 2015
 - aanvraag compleet: 21 augustus 2015
 - in vergadering besproken: 8 juli 2015, 05 augustus 2015 en 09 september 2015

anderszins behandeld

termijnonderbreking(en) van / tot

besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen

 - aanpassing aanvraag: 28 juli 2015 en 21 augustus 2015

advies aan CCD
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 13 juli 2015 en 07 augustus 2015.
 - Strekking van de vragen

Vragen d.d. 13 juli 2015:

 - Vraag of de aangevinkte doelcategorie van het project wel correct is.

- Nadere toelichting en beschrijving m.b.t. wetenschappelijke achtergrond, referenties aan sleutelpublicaties, de maatschappelijke last van influenza virusinfecties, het belang van dit project, en de eigen ervaring/achtergrond van de instelling m.b.t. dit onderzoeksgebied.
- Toelichting m.b.t. de haalbaarheid van dit project.
- Nadere toelichting en beschrijving van de algemene opzet van het project.
- Beschrijving van de logische samenhang van de verschillende onderdelen. En onderbouwing van het onderbrengen van deze verschillende onderdelen binnen 1 projectaanvraag.
- Nadere toelichting en onderbouwing van de humane eindpunten en het percentage dieren dat naar verwachting het humane eindpunt zal bereiken.
- Tekstueel en redactioneel (verduidelijking en onderlinge afstemming van bepaalde tekstpassages en correcte invulling van het formulier). Aanpassing van de NTS conform de toelichting bij het formulier.

Vragen d.d. 07 augustus 2015:

- Opmerking van de commissie m.b.t. de aangekruiste doelstellingen, nl. zowel fundamenteel als translationeel onderzoek. De commissie is van oordeel dat er bij dit project grotendeels, en misschien wel geheel, sprake is van translationeel of toegepast onderzoek. De commissie heeft dit aspect nadrukkelijk in haar afweging betrokken en een eventuele bijstelling van de tekst hierover heeft naar het oordeel van de commissie dan ook geen consequenties voor de ethische afweging.
- Opmerking m.b.t. de onderlinge samenhang van de verschillende doelstellingen en combinatie ervan in 1 projectaanvraag, welke niet geheel voor de hand lijkt te liggen. De commissie heeft dit aspect in haar afweging betrokken en is er wel van overtuigd dat alle drie de experimenten uiteindelijk bijdragen aan het up to date houden van influenzavaccins door informatie te vergaren over de eigenschappen van influenzavirussen en dat dit project dus een toetsbare eenheid vormt. De huidige beschrijving van de doelstelling hoeft naar het oordeel van de commissie derhalve geen belemmering te vormen voor de ethische afweging.

- Tekstueel en redactioneel: consistent op elkaar afstemmen van NTS en de overige documenten van deze projectaanvraag, w.b.t. de beschreven doelstellingen.
 - Datum antwoord: 21 juli 2015 en 21 augustus 2015
 - Strekking van de antwoorden: de vragen en opmerkingen van de DEC zijn naar tevredenheid beantwoord; aanvraag na bijstelling volledig en duidelijk.
 - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t., de DEC zelf beschikt over de relevante expertise.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project of de aanvrager.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Influenza epidemieën brengen een hoge ziektelast en veel maatschappelijke kosten met zich mee. De eigenschappen van influenzavirussen veranderen in verloop van tijd aanzienlijk, een verschijnsel dat bekend staat als 'antigene drift'. Als gevolg hiervan dient het jaarlijkse influenza vaccin regelmatig te worden aangepast om voldoende bescherming te kunnen bieden tegen de dan circulerende seizoensvirussen. Wereldwijde surveillance en monitoringsprogramma's zijn dan ook van groot belang om de evolutie van circulerende influenzavirussen in de gaten te houden en om te

kunnen adviseren omtrent de samenstelling van de seizoensinflenzavaccins. Daarnaast is er een constante dreiging van het uitbreken van een influenza pandemie (zgn. 'antigene shift', de introductie van een voor de mens nieuw influenza virus). Monitoring van influenzavirussen is derhalve tevens van groot belang om zo goed mogelijk voorbereid te blijven op mogelijke pandemische uitbraken. In dit project wordt onderzocht of antisera geproduceerd in fretten tegen de huidige, bekende virussen nog kruisreageren met nieuw circulerende virussen. De in dit project verkregen antiserum preparaten worden tevens gebruikt in de kwaliteitscontrole van diverse serologische assays. Tenslotte worden dose-finding en dose-confirmation studies uitgevoerd met respectievelijk nieuw te testen en reeds uitgeteste influenza virussen om een goede inschatting te kunnen maken van de te gebruiken doses in interventiestudies.

Dit project draagt bij aan het tijdig beschikbaar komen van seizoensvaccins en pandemische vaccins die goed zijn afgestemd op de op dat moment circulerende influenzavirussen en die een zo breed mogelijke bescherming bieden.

- 4.** De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De instelling heeft een uitgebreide ervaring met het uitvoeren van dit soort testen (in opdracht van derden) en beschikt over gespecialiseerde kennis m.b.t. de gebruikte diermodellen.
- 5.** Er is in wettelijk opzicht geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
- 6.** Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De dieren worden geïnfecteerd met seizoensinflenzavirussen of 'pandemische' influenzavirussen. Bij het gebruik van laag pathogene virussen ondergaan de dieren maximaal matig ongerief, als gevolg van herhaalde sedatie (ten behoeve van het uitvoeren van de experimentele handelingen) en ziekteverschijnselen als gevolg van de influenza infectie. Bij gebruik van hoog pathogene virussen wordt het ongerief voor (een deel van de dieren) ingeschat op maximaal ernstig, als gevolg van herhaalde sedatie en ziekteverschijnselen.
- 7.** De kans op ernstig ongerief is variabel (0 - 100%) en is afhankelijk van het te

testen influenza virus.

- 8.** Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De materialen en data verkregen uit deze studies kunnen niet worden gegenereerd met proefdiervrije methoden.
- 9.** In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aantallen dieren zijn gebaseerd op resultaten uit het verleden.
- 10.** Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Invasieve handelingen worden uitgevoerd onder anesthesie. De dieren worden dagelijks en indien nodig meerdere malen per dag geobserveerd. Dieren die het humane eindpunt bereiken worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
- 11.** De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Op basis van de overwegingen onder bovenstaand punt C (1 t/m 9) komt de commissie tot de volgende ethische afweging.

Dit project omvat dierproeven die worden uitgevoerd in het kader van wereldwijde surveillance- en monitoringsprogramma's waarin de evolutie van circulerende influenzavirussen wordt gevolgd. De gegevens worden gebruikt om te kunnen adviseren omtrent de samenstelling van de seizoensinflenzavaccins en om tijdig de dreiging van pandemische uitbraken te kunnen onderkennen. Influenza epidemieën brengen een hoge ziektelast en veel maatschappelijke kosten met zich mee. Een influenza pandemie kan zelfs de samenleving ontwrichten. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. Naar het oordeel van de DEC dient het project dan ook een zeer substantieel belang.

Tegenover dit substantiële belang staat het feit dat de dieren in deze experimenten meestal matig, maar in sommige gevallen ook ernstig ongerief zullen ondervinden. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven

adequaate invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. De experimenten zijn onderdeel van een wereldwijd surveillance- en monitoringprogramma en de opzet ervan is afgestemd in nauw overleg tussen de deelnemende centra. Die opzet komt overeen met wat in dit veld gebruikelijk is. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is derhalve onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren. De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren.

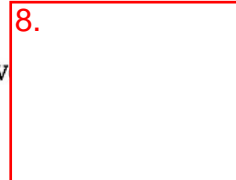
De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD905002015149

Bijlagen

2

Datum 24 september 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002015149. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 90500
Naam instelling of organisatie: BioXpert BV
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 54838134
Straat en huisnummer: Nistelrooise Baan 3
Postcode en plaats: 5374 RE SCHAIJK
IBAN: NL72RABO0183605888
Tenaamstelling van het rekeningnummer: BioXpert BV

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Viroclinics Biosciences B.V.
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Viroclinics Biosciences B.V.
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Scientific support
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 september 2015
Geplande einddatum: 1 september 2020
Titel project: Onderzoek naar nieuwe en bevestiging van reeds uitgeteste influenza virussen in fretten
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar infectie met griepvirussen in fretten
Naam DEC: [REDACTED]
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:

Vergunninghouder

Plaats:

Schaijk

Datum:

20 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD905002015149

Bijlagen

2

Datum 24 september 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

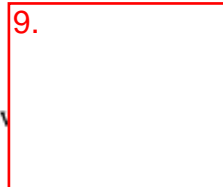
Factuurdatum: 24 september 2015

Vervaldatum: 24 oktober 2015

Factuurnummer: 15700149

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015149	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3
5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015149

Datum 29 september 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen

1

Geachte heer/mevrouw,

Op 21 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Onderzoek naar nieuwe en bevestiging van reeds uitgeteste influenza virussen in fretten met aanvraagnummer AVD905002015149. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

De niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat enkele tekstuele fouten en moeilijke woorden, zoals extrapolatie. Daarnaast staat bij 4.3 bij de verschillende vragen hetzelfde antwoord. Graag ontvangen wij een Niet technische samenvatting die voldoet aan de eisen. Deze eisen kunt u vinden op onze website www.centralecommissiedierproeven.nl.

Onduidelijkheden

Uw project bevat enkele onduidelijkheden.

Kunt u de samenhang tussen Dierproef 1 en de Dierproeven 2 en 3 aangeven?
Hoe wordt de dosis bepaald voor Dierproef 1; hoe wordt voorkomen dat dieren sterven zonder dat bloedafname mogelijk is?

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum
29 september 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015149

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

Aan: IvD BioXpert, CCD

Betreft Aanvullende informatie onderzoeksplan getiteld: Onderzoek naar nieuwe en bevestiging van reeds uitgeteste influenza virussen in fretten. (CCD nr: AVD905002015149).

Datum: 02 October 2015

Beste leden van de IvD / Geachte leden van de CCD,

Met referentie naar uw verzoek om aanvullende informatie ontvangen op 29 september 2015 stuur ik u hierbij mijn antwoord op de vraag gesteld in uw schrijven.

Vraag 1:

Niet technische samenvatting: De niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat enkele tekstuele fouten en moeilijke woorden, zoals extrapolatie. Daarnaast staat bij 4.3 bij de verschillende vragen hetzelfde antwoord. Graag ontvangen wij een Niet technische samenvatting die voldoet aan de eisen. Deze eisen kunt u vinden op onze website www.centralecommissiedierproeven.nl.

Antwoord vraag 1:

We hebben de NTS nogmaals doorgelopen en daar waar mogelijk mogelijk lastig te interpreteren woorden aangepast, zodat de tekst ook begrijpelijk is voor een leken-publiek. Op een enkel punt is er ook geschoven met de tekst om het geheel begrijpelijker te maken. Wat betreft de dubbele tekst bij 4.3: op 25 september j.l. is reeds een nieuwe versie per mail naar de CCD gestuurd aangezien dit ook bij de aanvrager op was gevallen. In bijgevoegd aangepast bestand (NTS) is dit ook reeds aangepast.

Vraag 2:

Onduidelijkheden: Uw project bevat enkele onduidelijkheden. Kunt u de samenhang tussen dierproef 1 en de Dierproeven 2 en 3 aangeven? Hoe wordt de dosis bepaald voor Dierproef 1; hoe wordt voorkomen dat dieren sterven zonder dat bloedafname mogelijk is?

Antwoord vraag 2:

Wat betreft de samenhang tussen dierproef 1 en de dierproeven 2 en 3. Zoals weergegeven in punt 3.4.3 van het projectvoorstel waarin de logische samenhang van de verschillende onderdelen moet worden beschreven staat hetvolgende: "Gezamenlijk wordt met dierproeven 1, 2 en 3 alle benodigde informatie voor het uittesten van de werkzaamheid van antivirale interventiestrategieën tegen (nieuwe) influenzavirussen gegenereerd waardoor de paraatheid ondersteund wordt die vereist is om snel en accuraat te kunnen (blijven) reageren op epidemische en pandemische dreiging ten gevolge van circulerende en nieuw geïntroduceerde influenzavirussen." Hiermee wordt aangegeven dat resultaten door infectie van fretten zoals beschreven in dit projectvoorstel allen leiden tot het verzamelen van informatie over de eigenschappen van influenza virussen via verschillende methoden. De logische samenhang is ook naar voren gekomen in correspondentie met de DEC, zoals weergegeven in het advies van de DEC: "Opmerking m.b.t. de onderlinge samenhang van de verschillende doelstellingen en combinatie ervan in 1 projectaanvraag, welke niet geheel voor de hand lijkt te liggen. De commissie heeft dit aspect in haar afweging betrokken en is er wel van overtuigd dat alle drie de experimenten uiteindelijk bijdragen aan het up to date houden van influenzavaccins door informatie te vergaren over de eigenschappen van influenzavirussen en dat dit project dus een toetsbare eenheid vormt. De huidige beschrijving van de doelstelling hoeft naar het oordeel van de commissie derhalve

geen belemmering te vormen voor de ethische afweging.” Ik hoop dat de CCD zich ook kan vinden in de beschrijving van de logische samenhang door de aanvrager en de beoordeling van de DEC. Wat betreft de tweede vraag over de dosis en de kans dat dieren vroegtijdig komen te overlijden zonder dat bloedafname mogelijk is. Een dergelijke situatie is alleen denkbaar bij het gebruik van mogelijk hoog pathogene virussen. Echter, zoals weergegeven in de figuur bij punt J (humane eindpunten) zijn ook voor hoog pathogene virussen doseringen beschikbaar waarbij de dieren daadwerkelijk geïnfecteerd worden, maar niet komen te overlijden voor het einde van de looptijd (in dit geval 14 dagen na infectie). Op grond van voorkennis van dergelijke virussen zal een dusdanige dosering gekozen worden, welke leidt tot het verwachte eindresultaat namelijk overleving tot dag 14 na infectie en seroconversie. Om dit te verduidelijken is een kleine aanpassing gemaakt in de bijlage welke dierproef 1 omschrijft en deze bijgestelde bijlage is ook toegevoegd. Hieronder is de eerste alinea weergegeven van punt A (Experimentele aanpak en primaire uitkomst parameters, sectie Beschrijf de beoogde behandeling...de gekozen aanpak) waarbij de aanpassingen hieronder zijn gemarkeerd:

Na een acclimatisatieperiode van minimaal 7 dagen zullen de dieren onder ketamine-medetomidine sedatie gewogen en geïnfecteerd worden met influenza virus via de intranasale en/of intratracheale route in een volume van respectievelijk 0.3ml en 3ml. De keuze van de route en de dosering zal afhangen van het te gebruiken virus en indien bekend van de receptor beschikbaarheid van dit virus in de luchtwegen (bovenste en onderste). Zoals beschreven door van Riel et al (AJP 2007) infecteren seizoens virussen voornamelijk de bovenste luchtwegen en in mindere mate de onderste luchtwegen. Pandemische virussen infecteren juist vooral de onderste luchtwegen en laten geen replicatie zien in de bovenste luchtwegen. Op basis van het klinisch beeld van de patiënt waar het isolaat uit afkomstig is kan bepaald worden of men te maken heeft met de eerste of de tweede. Wat betreft de dosering zal een dusdanige dosering gekozen worden dat de dieren overleven tot dag 14 na infectie, zodat inderdaad seroconversie opgetreden zal zijn (zie figuur bij punt J waarbij voor verschillende klassen virussen een dose-response curve is weergegeven).

Ik hoop u hiermede voldoende te hebben geïnformeerd om dit projectvoorstel in de eerstvolgende vergadering te behandelen.

Met vriendelijke groeten,

██████████, ██████████
██

Viroclinics Biosciences B.V.
Rotterdam Science Tower
Marconistraat 16
3028 AK Rotterdam

██████████████████
██████████████████



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u 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.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Antiserum productie na infectie met influenza virus

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor de productie van antiserum zullen de dieren geïnfecteerd worden via de intranasale en/of intratracheale route. Primaire uitkomstparameter zal seroconversie zijn na infectie. Resultaten uit het verleden hebben aangetoond dat in slechts een enkel geval infectie niet aanslaat en niet zal leiden tot seroconversie.

NB: indien het een nieuw virus betreft waarvan nog geen informatie voorhanden is over de replicatie kinetiek in de luchtwegen kan besloten worden om met een weinig invasieve werkwijze de luchtwegen (neus en keel) te bemonsteren ten behoeve van virologische analyse. Deze bemonstering heeft geen invloed op het ontwikkelen van de immunrespons tegen het virus en dus ook niet op de seroconversie.

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

Na een acclimatisatieperiode van minimaal 7 dagen zullen de dieren onder ketamine-medetomidine sedatie gewogen en geïnfecteerd worden met influenza virus via de intranasale en/of intratracheale route in een volume van respectievelijk 0.3ml en 3ml. De keuze van de route en de dosering zal afhangen van het te gebruiken virus en indien bekend van de receptor beschikbaarheid van dit virus in de luchtwegen (bovenste en onderste). Zoals beschreven door van Riel et al (AJP 2007) infecteren seizoens virussen voornamelijk de bovenste luchtwegen en in mindere mate de onderste luchtwegen. Pandemische virussen infecteren juist vooral de onderste luchtwegen en laten geen replicatie zien in de bovenste luchtwegen. Op basis van het klinisch beeld van de patiënt waar het isolaat uit afkomstig is kan bepaald worden of men te maken heeft met de eerste of de tweede. Wat betreft de dosering zal een dusdanige dosering gekozen worden dat de dieren overleven tot dag 14 na infectie, zodat inderdaad seroconversie opgetreden zal zijn (zie figuur bij punt J waarbij voor verschillende klassen virussen een dose-response curve is weergegeven).

Twee weken na de infectie zullen de dieren gewogen en geëuthanaseerd worden onder ketamine-

medetomidine sedatie door middel van verbloeden via hartpunctie. Deze periode tussen infectie en verbloeden is dusdanig gekozen dat het antiserum nog een hoge specificiteit heeft tegen het virus waarmee geïnfecteerd is. Indien voor een later tijdstip gekozen wordt bevat het antiserum een meer bredere specificiteit waardoor bijvoorbeeld typering van virussen op basis van antiserum niet meer mogelijk is. Eerdere bemonstering is niet van toepassing aangezien de hoogte van de immunrespons dan nog te laag is om te gebruiken in de voorgestelde testen.

NB: indien in het uitgevoerde experiment ook de replicatie kinetiek bestudeerd gaat worden, zullen de dieren op dag van infectie (pre-monster) en dagelijks (t/m dag 7) na infectie bemonsterd worden uit de luchtwegen (keel en neus) onder ketamine sedatie. Deze eerste resultaten kunnen gebruikt worden om een eventuele dose-finding (zie dierproef 2) te verfijnen. De keuze om deze bemonstering te beëindigen op dag 7 na infectie is vanwege het feit dat eerder (gepubliceerd) onderzoek heeft aangetoond dat de piek van de virale replicatie binnen deze eerste 7 dagen zal plaatsvinden.

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

In principe zullen per virus [REDACTED] dieren geïnfecteerd worden om het antiserum op te wekken. De jarenlange ervaring van het Nederlands Influenza Centrum (NIC) welke ondergebracht is bij de afdeling Viroscience van het Erasmus MC, heeft geleerd dat de opbrengst van [REDACTED] dieren per isolaat voldoende is voor het uitvoeren van de gewenste testen. Maatstaf zal hier zijn dat het bloedvolume ongeveer 7-8% van het lichaamsgewicht is en dat bij opwerken ongeveer 40% van het bloedvolume uit serum zal bestaan. Voor een mannelijke fret van 800 gram zal dit dus een serum volume van 20-25ml zijn.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Diersoort: fretten (mannelijk) van 6-18 maanden.

De fret is zeer gevoelig voor infectie met wild-type (niet laboratorium-geadapteerde en klinisch relevante) influenza virussen. Daarom worden fretten al jaren gebruikt voor het maken van influenza-specifiek antiserum. Vanwege het hogere lichaamsgewicht en dus ook bloedvolume wordt altijd gebruik gemaakt van mannelijke fretten.

Herkomst: geregistreerde leverancier in de EU

Er is een jarenlange relatie met de betreffende fokker en in overleg met de aanvrager is een huisvestingsregime opgesteld dat de influenza-specifieke seronegativiteit van de dieren waarborgt.

Geschatte aantal: [REDACTED] dieren in 5 jaar

Er wordt verwacht om per jaar voor 10 verschillende influenza virussen antiserum op te wekken. Per jaar circuleren er 4 verschillende influenza virussen (1x H1N1, 1x H3N2 en 2xB) en de verwachting is om per jaar voor minimaal elk virus antiserum op te wekken tegen een drift variant (mogelijk afwijkende virus variant). Daarnaast ligt het in de verwachting om per jaar ook antiserum op te wekken tegen 2 "emerging influenza viruses".

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: de dierproeven die vallen onder dit project zijn opgezet ter productie van antiserum tegen influenza virus. Dit is in vitro niet na te bootsen. Aangezien fretten te infecteren zijn met wild-type virussen

in tegenstelling tot muizen die over het algemeen alleen te infecteren zijn met muis-geadapteerde influenza virussen, is dit het kleinst mogelijke en meest relevante model om antiserum te produceren.

Vermindering: de benodigde hoeveelheid antiserum is leidend in deze experimenten. Er wordt altijd gebruik gemaakt van mannelijke fretten, omdat mannelijke fretten een hoger lichaamsgewicht hebben en dus een groter bloedvolume.

Verfijning: Meest invasieve behandelingen zullen uitgevoerd worden onder anesthesie en dieren worden dagelijks geobserveerd. Indien de klinische symptomen daartoe aanleiding geven zullen de dieren frequenter geobserveerd worden en daarnaast zullen ze indien dit nodig is vanuit welzijnsstandpunt ook vaker gewogen worden. De hoogte van intensivering is mede bepaald door fase waarin de studie zich bevindt. Tijdens de challenge fase kunnen klinische symptomen zeer snel tot uiting komen omdat de replicatie van influenza een logaritmische curve doormaakt. Zo kan bijvoorbeeld aan het eind van de dag besloten worden om laat op de avond nog een extra controle tijdstip in te voegen vanwege dierwelzijnsstandpunt om te voorkomen dat een humaan eindpunt bereikt wordt voor het volgende controle moment.

Tevens kan besloten worden, indien het een nieuw virus betreft waarvan nog geen informatie voorhanden is over de replicatie kinetiek in de luchtwegen, om met een weinig invasieve werkwijze de luchtwegen (neus en keel) te bemonsteren ten behoeve van virologische analyse tijdens de eerste fase van de infectie. Deze bemonstering heeft geen invloed op het ontwikkelen van de immunrespons tegen het virus en dus ook niet op de seroconversie. Met deze eerste resultaten kunnen vervolgens dose-finding experimenten beter geoptimaliseerd worden wat betreft bijvoorbeeld challenge condities of opvolgtijd na infectie wat kan leiden tot verfijning en vermindering in vervolg experimenten.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat de dieren gehuisvest zullen worden na infectie onder klasse II of klasse III inperking. Afval (bedding, kadavers en andere gebruikte materialen) zal aangeboden worden voor destructie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

In het algemeen hebben analgetica een ontstekingsremmende werking en dergelijke bijverschijnselen zijn niet verenigbaar met een dierproef waarin het opwekken van een ontsteking (bijvoorbeeld een immuunrespons t.g.v. een infectie) een belangrijke rol speelt (in dit geval de productie van antilichamen).

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Agressie binnen de groep

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Verandering van leefomgeving (bv verhuizing van standaard groepshuisvesting naar klasse III inperking) of gebruik van dieren die niet eerder samen gehuisvest waren.

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

Er zal kooiverrijking aangeboden worden welke geen gevaar oplevert voor de medewerkers indien dieren onder klasse III inperking gehuisvest worden. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan schuilmogelijkheden welke het uitvangen van de dieren bemoeilijken met bijt-accidenten als gevolg. Daarnaast is de leverancier van fretten dusdanig uitgekozen dat agressie niet of nauwelijks een rol speelt in deze dieren.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Infecties met influenza virus kunnen leiden tot ernstige ziekte gekenmerkt door: respiratoire problemen, neurologische verschijnselen, diarree, dyspnoe, afwezigheid van eetlust, lethargie en gewichtsverlies van >20%. Na infectie zullen de dieren uitvoerig gevolgd worden voor het detecteren van deze verschijnselen. Aangezien het ongerief en de desbetreffende humane eindpunten afhankelijk zijn van het gekozen virus, zijn deze hieronder uitgesplitst naar infectie met laag en hoog pathogeen influenza virus. Tevens zijn twee criteria toegevoegd waarbij dieren direct geëuthanaseerd zullen worden en die onafhankelijk zijn van het gekozen virus (laag of hoog pathogeen). Bij het vertonen van een van de volgende humane eindpunten zal het betreffende dier geëuthanaseerd worden:

Laag pathogeen influenza virus:

- Gewichtsverlies: tijdens de infectie fase worden de dieren dagelijks gewogen. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier 10% of meer gewicht verliest (geclassificeerd als matig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van infectie (althoewel de middelen daartoe erg beperkt zijn, kan ook bekeken worden tijdens de infectie fase of een betreffend dier solitair gehuisvest kan

worden).

NB: Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van normale naar een verhoogde ademhalingsfrequentie. Aangezien deze verhoogde ademhaling frequentie niet wordt beschouwd als hoger ongerief dan dat wordt veroorzaakt door herhaalde bemonstering (matig), is dit geen humaan eindpunt bij laag pathogene virussen.

Hoog pathogeen influenza virus:

- Gewichtsverlies: tijdens de infectie fase worden de dieren dagelijks gewogen. Het humane eindpunt is gedefinieerd als het betreffende dier 20% of meer gewicht verliest (geclassificeerd als ernstig ongerief) t.o.v. het startgewicht op de dag van infectie (alhoewel de middelen daartoe erg beperkt zijn, kan ook bekeken worden tijdens de infectie fase of een betreffend dier solitair gehuisvest kan worden).
- Respiratie: bij verergering van de ziekte zal de ademhaling veranderen van een verhoogde ademhalingsfrequentie (matig ongerief) naar moeizaam ademen (ernstig ongerief) of zelfs een stokkende ademhaling (dyspnoe). De moeizame ademhaling is te zien aan het meedoen van de flanken van het dier bij het ademen. Daarnaast kan het zo zijn dat het betreffende dier niet meer bij de andere dieren (opgerold) ligt, maar juist apart gaat liggen en gestrekt om het ademen te vergemakkelijken.
- Diarree: indien in de huisvesting te zien is dat een of meerdere dieren diarree (geclassificeerd als matig) hebben, zullen alle dieren afzonderlijk beoordeeld worden om te bepalen of er aanwijzingen zijn (vuile vacht rond de anus) welke dieren daadwerkelijk diarree vertonen.

Laag of hoog pathogeen virus:

Bij de volgende verschijnselen zullen de dieren direct geëuthanaseerd worden (beide geclassificeerd als ernstig ongerief):

- Neurologisch: in enkele gevallen kan het virus vanuit de neus van het dier doorslaan naar de hersenen en zo een ontsteking van de hersenen induceren. De daarbij behorende verschijnselen zijn onstabiele gang en ongecontroleerde bewegingen (zoals beschreven in Bodewes et al 2015 AJP).
- Lethargie: indien een dier lethargisch is (maw als het niet meer reageert op externe prikkels).

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

Het verloop van klinische verschijnselen zal afhankelijk zijn van het gekozen influenza virus (laag of hoog pathogeen) en zal derhalve hieronder uitgesplitst worden:

In het geval van laag pathogene (seizoens)influenzavirussen is de kans hierop heel klein, $\leq 5\%$ (het waarnemingspercentage in eigen experimenten in het verleden is 0%).

In het geval van hoog pathogene ("emerging", pandemische, aviaire) influenzavirussen is de kans hierop variabel, afhankelijk van virulentie en dosis van het te gebruiken virus: 0 - 100%. Hieronder ter verduidelijking een figuur met data uit een vergelijkbare studie met dit soort influenzavirussen (██████████).

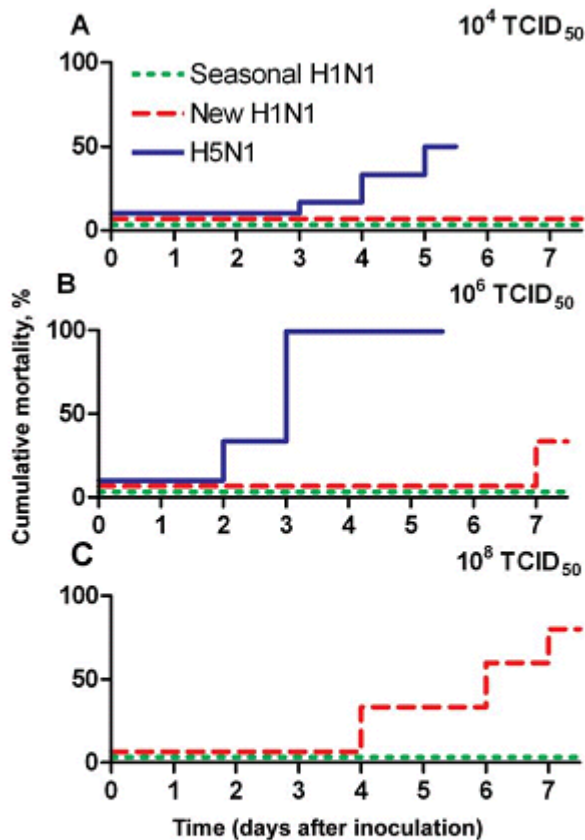


Figure 1. Cumulative mortality rates of ferrets inoculated with different influenza viruses. Ferrets were intratracheally inoculated with seasonal H1N1 ($n = 3$), new H1N1 ($n = 6$), or highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 ($n = 6$) influenza viruses at a dose of 10^4 (A), 10^6 (B), or 10^8 (C) median tissue culture infective dose (TCID₅₀). Cumulative mortality for new H1N1 virus was intermediate between that for seasonal H1N1 virus and that for HPAI H5N1 virus.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatieve ongerief voor deze experimenten wordt ingeschaald op matig voor laag pathogene seizoens influenza virussen en ernstig voor hoog pathogene (mogelijk pandemische) influenza virussen.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De gemiddelde benodigde hoeveelheid antiserum is niet te verkrijgen door bloedafname, maar dient te gebeuren door middel van verbloeden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015149

12 OKT 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 21 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar nieuwe en bevestiging van reeds uitgeteste influenza virussen in fretten" met aanvraagnummer AVD905002015149. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 2 oktober 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld. Er is een nieuwe NTS verstuurd, de samenhang tussen de verschillende Bijlagen Dierproeven is verder uitgewerkt en de dosisbepaling bij Dierproef 1 is benoemd.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Onderzoek naar nieuwe en bevestiging van reeds uitgeteste influenza virussen in fretten" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 oktober 2015 tot en met 1 september 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie [REDACTED] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 9 september 2015.

Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. De CCD stelt wel algemene voorwaarden aan dit project. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

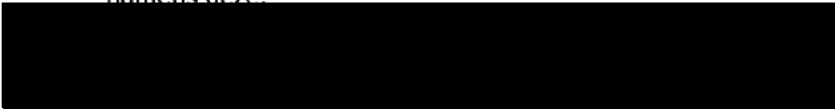
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
- DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: BioXpert BV
Adres: Nistelrooise Baan 3
Postcode en plaats: 5374 RE SCHAIJK
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 oktober 2015 tot en met 1 september 2020, voor het project "Onderzoek naar nieuwe en bevestiging van reeds uitgeteste influenza virussen in fretten" met aanvraagnummer AVD905002015149, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED]

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Voorzitter Ivd verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 september 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 september 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 oktober 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 september 2015, ontvangen op 21 september 2015.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 2 oktober 2015

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Antiserum productie na infectie met influenza virus	Fretten (<i>Mustela putorius furo</i>) / mannelijk; 6-18 maanden	[REDACTED]	Ernstig / severe	Laag pathogeen: Matig ongerief; Hoog pathogeen: Ernstig ongerief
Dose-finding van een nog niet uitgetest influenza virus	Fretten (<i>Mustela putorius furo</i>) / 6-18 maanden	[REDACTED]	Ernstig / severe	Laag pathogeen: Matig ongerief; Hoog pathogeen: Ernstig ongerief
Dose-confirmation van een reeds uitgetest influenza virus	Fretten (<i>Mustela putorius furo</i>) / 6-18 maanden	[REDACTED]	Ernstig / severe	Laag pathogeen: Matig ongerief; Hoog pathogeen: Ernstig ongerief

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het

project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proefdieren conform de vergunning waren.

Inventaris Wob-verzoek W17-05										
nr.	document NTS 2015154	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	Projectvoorstel			x						
3	Bijlage beschrijving dierproeven initieel			x						
4	NTS	x								
5	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
6	DEC advies				x		x	x		
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
8	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
9	Bijlage beschrijving dierproeven aangepast			x						
10	Formulier meldingen				x		x	x		
11	Begeleidende brief bij antwoorden				x		x	x		
12	Advies CCD aan bestuur		x							x
13	Beschikking				x		x	x		



1.

22 JULI 2015

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 90500
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie BioXpert B.V.
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted]

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.

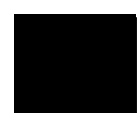
KvK-nummer 54838134
 Straat en huisnummer Nistelrooise Baan 3
 Postbus [Redacted]
 Postcode en plaats 5374RE Schaijk
 IBAN NL72RABO0183605888

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

Tenaamstelling van het rekeningnummer BioXpert BV
 (Titel) Naam en voorletters [Redacted] Dhr. Mw.
 Functie [Redacted]
 Afdeling Viroclinics Biosciences B.V.
 Telefoonnummer [Redacted]
 E-mailadres [Redacted]

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters [Redacted] Dhr. Mw.
 Functie [Redacted]
 Afdeling Viroclinics Biosciences B.V.
 Telefoonnummer [Redacted]
 E-mailadres [Redacted]



- 1.6 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [REDACTED] | |
| Afdeling | BioXpert | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6
-

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 8 - 2015 |
| Einddatum | 31 - 7 - 2016 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de potentie van een respiratoir syncytieel virus (RSV) F eiwit vaccin en een Adenoviraal RSV-F vaccin om antistoffen op te wekken tegen RSV in jong volwassen cavia's.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------|
| Naam DEC | DEC Leiden |
| Postadres | |
| E-mailadres | [REDACTED] |



4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
-

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[REDACTED]
Functie	Vergunninghouder
Plaats	Schaijk
Datum	23 - 6 - 2015
Handtekening	[REDACTED]



BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3
5374 RE Schaijk
The Netherlands
T: +31 (0) 486-463303
F: +31 (0) 486-463498

info@bioxpert.nl
www.bioxpert.nl

Aan: Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Datum: 18 juli 2015

Betreft: Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD905002015154

Geachte heer / mevrouw,

Bijgaand de getekende aanvraag Projectvergunning Dierproeven AVD905002015154 met als titel:

RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs.

Deze aanvraag is vandaag met de beveiligde e-mailverbinding ingediend.

Met vriendelijke groet,



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

In the context of vaccine and antiviral compound (hereafter referred to as "antiviral intervention strategies") development, Viroclinics Biosciences offers preclinical models in which these strategies can be tested in relevant in vivo settings. Different animal models are available for studying intervention strategies against respiratory syncytial virus (RSV), that all have their strengths and weaknesses. The

choice for a particular animal model will depend on the study objective in question. This is discussed in detail with the sponsor during design of the studies. Of all preclinical models for RSV infection, the guinea pig is the most optimal model for our objective since placentation and transplacental transport of antibodies is comparable in guinea pigs and humans.

This model can be used to assess the characteristics of a multitude of antiviral intervention strategies, be they (monoclonal) antibody preparations, antiviral pharmaceutical substances, vaccines, or a combination thereof.

This project proposal aims at investigating the immunogenicity of newly developed RSV vaccines in the guinea pig model. The results will be used to determine the most optimal prime-boost regimen to be able to assess transplacental transfer of RSV specific maternal antibodies to pups in future studies, which will be subject of another project proposal to be completed after conclusion of this study.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The studies described in this project proposal address the testing of newly developed biological products with regards to their immunogenicity, i.e. their capacity to induce RSV neutralizing antibody responses in guinea pigs.

The outcome of the studies in this project will be used to design future studies to test the efficacy of new candidate RSV vaccines to generate protective immunity in newborn guinea pigs in a maternal vaccination model.

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

In general, RSV causes relatively mild common cold-like upper respiratory tract infections in individuals of all ages. However, RSV also plays a major part in the annual number of people succumbing to lower respiratory tract infections; global RSV disease burden is estimated at 64 million cases and 160000 deaths every year (WHO, 2009). Especially vulnerable target populations include newborns, children below the age of 2, elderly, individuals with underlying co-morbidities like heart and lung diseases or immunocompromised individuals.

Even after extensive research and development, a vaccine for any of the above groups is still not available. RSV vaccine research is still severely hampered by a failed trial in the 1960s in which an Alum-adjuvanted formalin-inactivated RSV vaccine primed for enhanced disease rather than protecting those vaccinated. Since then numerous vaccination strategies have been explored, however since RSV infection continues to occur, even in sero-positive individuals, vaccines have to do "better" than the infection itself. Additionally, an important target for protection against disease are the very young, but vaccination is either difficult or not in time to protect against disease which mostly occur very early after birth. To protect the very young, maternal vaccination during pregnancy is an important point to consider. Prenatally, maternal antibodies are actively transferred to babies through the placenta and as such could provide prophylactic protection against subsequent infection during early life. Enhanced disease as seen in the 1960s is not applicable since the mothers have been in contact numerous times with RSV and are therefore not prone to develop enhanced disease and additionally this enhanced disease is not transferrable from mother to child. Thus, vaccination strategies aimed at inducing high levels of antibodies in pregnant mother are important candidate vaccines to be used against protection of young babies. Alternatively, vaccines that prove to be very immunogenic in the proposed model could also be used in other target populations at risk.

A number of RSV vaccine candidates are in development of which vaccines based on the RSV fusion (F) protein are the most promising candidates. The RSV F protein is one of three glycoproteins of RSV and a major target against which immunological responses are generated. Also, the RSV F protein is highly conserved between different strains of RSV, in contrast to the attachment (G) protein, and is highly expressed, in contrast to the M2 protein, after infection. Therefore the RSV F protein represents an important target able to induce broad reaction when used as vaccine antigen. Finally, a monoclonal antibody with neutralizing capacity that targets the RSV F protein (Synagis) has been shown to reduce

RSV disease burden (through a significant reduction of hospitalizations) in high-risk infants. Since in general proteins themselves are not very immunogenic, the immune response during vaccination may have to be boosted by the use of an appropriate, clinically relevant, adjuvant (Adjuphos). This adjuvant has been shown to be effective without the occurrence of adverse effects in several preclinical models, including mice, cattle, and macaques (de Swart, J. Virol, 2002; de Waal, Vaccine, 2004; Kateregga, BMC Vet Res, 2012).

An additional vaccination strategy against RSV are either attenuated RSV viruses or recombinant (either replication deficient or not) viruses expressing one or more RSV proteins. However, use of attenuated RSV viruses could pose a problem, because it has been shown that it is difficult to find a proper balance between attenuation and immunogenicity. Additionally, since infection with the wild-type viruses does not induce life-long immunity, the attenuated virus has to do better than the wild-type. Recombinant viruses, either or not replication deficient, could be better candidate vaccines, since expression of the transgene (main target for the immune response) can be driven by the choice of the vector. In the current study a replication competent adenovirus type 35 construct will be used. This type is less abundant in the human population compared to other adenovirus types, and pre-existing immunity against the vector is therefore less likely to impair its immunogenicity. Since this vector can replicate in the host, the transgene is highly expressed and therefore it is suggested that high levels of protection can be achieved after vaccination.

A number of animal models are available to investigate efficacy against RSV infection, and which one is to be used depends on the objective of the study. In cases where the objective is to study the potential of maternal vaccination strategies against RSV, the guinea pig is the most relevant, since the placentation of the guinea pig is comparable to humans and antibodies are transferred from the mother to the foetus via similar transplacental transport mechanisms. Maternal immunity is the main early defence against infectious agents in newborns. Transfer of IgG is transported through either the colostrum or the placenta. Of the (5) different classes of antibodies, only IgG can be transferred through the placenta. The number of membranes separating the maternal and foetal blood circulation determines the placenta types found in different species: epitheliochorial, synepitheliochorial, endotheliochorial or hemochorial. Humans and guinea pigs have hemochorial placentas, through which maternal IgG transfer is mediated by neonatal Fc receptors (FcR), which are specific for the Fc portion of IgG.

Guinea pig gestational periods are lengthy compared to other rodents, ranging from 65-70 days (Bai, Rev Infect Dis., 1983), through which the relative length of pregnancy and the development of the young at the time of delivery closely resemble that of humans.

As the guinea pig has a placental architecture which is similar to that of humans, and there is prenatal transfer of antibodies to the foetus, this model has been established for research into infectious diseases, especially prevention and treatment of maternal-foetal transmission of cytomegalovirus (Schleiss & McVoy, Future Virol., 2010). Also, maternal immunization against RSV has been studied in guinea pigs. Pups born to immune mothers (by RSV infection) have been shown to acquire serum-neutralizing antibodies to RSV and shown significant protection compared to pups born from non-immune mothers (Buraphacheep, JID, 1997). These features render the guinea pig a useful model to study trans-placental transfer of (RSV specific) antibodies and maternal immunization strategies against RSV.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

The results of the study carried out in the context of the current project will be used to develop an animal model to test the influence of maternally derived antibodies (MDA) against RSV infection in young infants. To this end, the appropriate model has to be chosen with the highest relevance for human testing. Since placentation of the guinea pig shows similarities with the human placentation this is an appropriate model. The vaccination strategies described in this project proposal have not been tested yet in this model. The current study is described in which the induction of the immune response is characterized after different vaccination strategies with regards to dose and adjuvation, but also vector. The results from this study will be used for future studies in which the trans-placental transport of these responses is investigated.

To investigate the immunogenicity of the recombinant RSV F protein (designated PRPM.CHO) different doses of this protein are used in a prime-boost regime in the presence or absence of a clinically-relevant adjuvant, Adjuphos. This adjuvant has been shown to be effective without the occurrence of adverse effects in several preclinical models, including mice, cattle, and macaques (de Swart, J. Virol, 2002; de

Waal, Vaccine, 2004; Kateregga, BMC Vet Res, 2012). Results will be analysed and the optimal vaccination regimen with regard to the induction of neutralizing antibodies will be selected for future studies on MDA in guinea pigs and their efficacy against infection with RSV in pups.

The recombinant adenovirus vector (Ad35 strain) expressing the RSV-F protein has never been used as vaccination regime in a preclinical setting and therefore this vaccine candidate is taken along in this study as proof of concept in a single vaccination regime (prime only). If results show good induction of immune responses against this adenovirus vector, future studies will aim at the appropriate dose of this vector.

Main objective of the study is to show the induction of functional antibody responses as measured by neutralization. However, since the correlates of protection against infection with RSV and the efficiency of the transport of antibodies through the placenta are not known, a threshold on the level of antibody responses cannot be determined.

Summarizing, the objective of the project is to test the immunogenicity of the following RSV candidate vaccines in young adult female guinea pigs:

- Different doses of the PRPM.CHO RSV F derived protein, a candidate vaccine consisting of a recombinant RSV fusion (F) protein, using a prime boost regimen, delivered either with or without the adjuvant AdjuPhos.
- A recombinant adenovirus vector (Ad35 strain) containing an insert that drives expression of the RSV F protein.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs (see schedule below):

1. After entry in the animal facilities the animals are housed for group 1-7 during the complete experiment under DM-I and for group 8 and 9 during acclimatization under DM-I and from day 0 onwards under DM-II conditions.
2. Animals receive a subcutaneous identification chip after an acclimatization period of minimal 7 days
3. On day 0 animals will be weighed, blood will be collected from all animals and all animals receive intramuscular or intranasal vaccination (group 1-7 and group 8, respectively) or intranasal infection (group 9) under isoflurane sedation.
4. On day 7 and 14 animals will be weighed without sedation
5. On day 28 animals will be weighed and blood will be collected under isoflurane sedation
6. On day 35 animals will be weighed, blood will be collected from all animals and animals from group 1-7 receive intramuscular vaccination under isoflurane sedation
7. On day 42 and subsequently every 7 days animals will be weighed and additionally blood will be collected from all animals on day 49 and 63 under isoflurane sedation.
8. On day 77 all animals will be euthanized by exsanguination under isoflurane sedation, followed by a lethal sodium pentobarbital dose.

NB: total collected blood volume will not exceed the total amount of 8 ml/kg/28 days

Study schedule: Immunisation & Sampling

Group	No/Group	Immunisation & sampling							
		d 0 Sample + Prime	d 28 Sample	d 35 Sample + Boost	d 49 Sample	d 63 Sample	d 77 Final Sample		
1	7	B	0.5 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	0.5 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	B
2	7	B	5 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	5 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	B
3	7	B	25 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	25 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	B
4	7	B	0.5 µg PRPM.CHO, IM	B	B	0.5 µg PRPM.CHO, IM	B	B	B
5	7	B	5 µg PRPM.CHO, IM	B	B	5 µg PRPM.CHO, IM	B	B	B
6	7	B	25 µg PRPM.CHO, IM	B	B	25 µg PRPM.CHO, IM	B	B	B
7	7	B	PBS	B	B	PBS	B	B	B
8	7	B	Ad35.Fdcp 10 ¹⁰ vp, IM	B	B	n.a.	B	B	B
9	7	B	10 ⁵ pfu RSV-A2, IN	B	B	n.a.	B	B	B

HOUSING	NORMAL/DM-II*
---------	---------------

* All animals will be housed in groups in normal cages. After priming, housing of groups 8 and 9 will be in DM-II conditions.

Abbreviations:

IM = intramuscular

IN= intranasal

B = whole blood for serum

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

The study is designed to evaluate the immunogenicity of various doses of the PRPM.CHO protein with and without adjuvation with AdjuPhos (Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark), in a prime-boost regimen in guinea pigs. Increasing protein doses will be used (0.5, 5 and 25µg per vaccination; groups 1 to 3 and 4 to 6) to determine the immunogenicity. Groups with and without AdjuPhos will be used to determine the immunostimulatory effect of a licensed adjuvant (AdjuPhos) for this protein vaccine preparation (groups 1 to 3 vs. groups 4 to 6). For adjuvation of antigen two different kinds of adjuvant can be used: negatively (e.g. AdjuPhos) or positively (e.g. Alhydrogel) charged. Choice of the adjuvant will depend on the charge of the antigen. In this case the antigen is positively charged, therefore the negatively charged AdjuPhos will be used.

Moreover, as a pilot, the immunogenicity of a high dose of Adenovector with an RSV F gene insert (Ad35.Fdcp) will be evaluated (group 8, prime only).

As gatekeepers, two control groups are included in which the animals are either i.m. injected with PBS (negative control, group 7), or primed with a high dose of RSV-A2 intranasally (positive control, group 9).

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	90500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	BioXpert	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	1	RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The Sponsor of the study is aiming to develop a RSV vaccine for prevention of RSV infections in young children.

The study is performed to assess the in vivo immunogenicity in guinea pigs of a) a recombinant PRPM.CHO protein when used as a prime-boost immunization and b) an Adenovector driving expression of RSV F. The PRPM.CHO protein is produced in CHO cells and is a processed variant of the pre-fusion RSV-A2 F protein, containing quintuple (5) mutations.

The concrete objectives of the study are the following:

1. Immunogenicity of different doses of the PRPM.CHO RSV F derived protein in guinea pigs in a prime boost regimen, delivered with and without AdjuPhos.
2. Immunogenicity of an Ad35 vector containing the insert of the RSV F protein in guinea pigs.

The level of RSV neutralizing Ab titers as determined by VNA on serum samples collected at day 49, will be used as primary outcome parameter. The results will be used to determine the most optimal prime-boost regimen to assess transplacental transfer of RSV specific maternal antibodies to pups in future studies, which will be subject of another project proposal to be completed after conclusion of this study.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

The study is designed to evaluate the immunogenicity of various doses of the PRPM.CHO protein with and without adjuvation with AdjuPhos (Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark), in a prime-boost regimen in guinea pigs. Increasing protein doses will be used (0.5, 5 and 25µg per vaccination; groups 1 to 3 and 4 to 6) to determine the immunogenicity. Groups with and without AdjuPhos will be used to

determine the immunostimulatory effect of a licensed adjuvant (AdjuPhos) for this protein vaccine preparation (groups 1 to 3 vs. groups 4 to 6). For adjuvation of antigen two different kinds of adjuvant can be used: negatively (e.g. AdjuPhos) or positively (e.g. Alhydrogel) charged. Choice of the adjuvant will depend on the charge of the antigen. In this case the antigen is positively charged, therefore the negatively charged AdjuPhos will be used. This adjuvant has been shown to be effective without the occurrence of adverse effects in several preclinical models, including mice, cattle, and macaques (de Swart, J. Virol, 2002; de Waal, Vaccine, 2004; Kateregga, BMC Vet Res, 2012). Moreover, to determine the immunogenicity of a high dose of Adenovector with an RSV F gene insert (Ad35.Fdcp) will be evaluated (group 8, prime only).

The animals will be vaccinated intramuscularly (i.m.) at day 0 (prime) and day 35 (boost) after which the immune response is studied for 42 days (6 weeks).

The maximum volume to be applied i.m. will not exceed 0.1 ml per injection site with a maximum of two injection sites/inoculation.

During the experiment blood will be collected from the animals at days 0 (pre vaccination), 28, 35, 49 and 63. Collection of blood (from the vena cava cranialis) and administration of prime and boost formulations will be performed under isoflurane anesthesia. The blood collection volumes will not exceed 8 ml/kg/28 days. On day 77 all animals are euthanized by exsanguination under isoflurane anesthesia, followed by a lethal sodium pentobarbital dose.

In the experiment two control groups are included in which the animals are either i.m. injected with PBS (day 0 and day 35, negative control, group 7), or primed at day 0 with a high dose (10^5 PFU/animal) of RSV-A2 intranasally (positive control, induction of F protein specific immune responses in the context of a natural infection, group 9).

Groups and administration specifics are given below:

Group	Prime		Boost		n=	adjuvant	route
	Item	Dose	Item	Dose			
1	PRPM	0.5 µg	PRPM	0.5 µg	7	AdjuPhos	i.m.
2	PRPM	5 µg	PRPM	5 µg	7	AdjuPhos	i.m.
3	PRPM	25 µg	PRPM	25 µg	7	AdjuPhos	i.m.
4	PRPM	0.5 µg	PRPM	0.5 µg	7	-	i.m.
5	PRPM	5 µg	PRPM	5 µg	7	-	i.m.
6	PRPM	25 µg	PRPM	25 µg	7	-	i.m.
7	PBS	-	PBS	-	7	-	i.m.
8	Ad35.Fdcp	10^{10} vp	-	-	7	-	i.m.
9	RSV-A2	10^5 pfu	-	-	7	-	i.n.

During the study the animals will be observed daily for general health checks, morbidity and mortality. Bodyweights will be determined at the start of the study, and once every week during the duration of the experiment.

Using the blood samples collected on the days mentioned above, the immunogenicity of the various formulations will be assessed by serological analysis in an RSV specific virus neutralization assay.

Data analysis

The primary aim of the experiment is to explore the dose response of the adjuvanted and non-adjuvanted PRPM.CHO, a recombinant RSV-A derived F protein, in guinea pigs. Furthermore, immunogenicity of an Ad35 vector containing the insert of the RSV F protein will be evaluated. As an exploratory analysis, the mean VNA titer (\log_2) and the standard deviation will be calculated for each group.

Immune responses on days 28, 35, 49, 63 and 77 will be evaluated by comparing VNA titers in Groups 1-6 and 8 with Group 7. Since it is expected that all animals of Group 7 will have Ab titers at the lower limit of quantification (LLOQ), a Wilcoxon Rank Sum test will be used for these comparisons and a Bonferroni correction for multiple testing will be applied. The consecutive serum samples will be used to

assess the kinetics of RSV neutralizing antibody development, i.e. sera obtained on days 63 and 77 will provide information on the longevity of the antibody response.

The effect of AdjuPhos on the immune responses will be determined by comparing Groups 1-3 with Groups 4-6 across doses. An analysis-of-variance for potentially censored measurements will be applied to the log2-transformed VNA titres. The statistical model contains dose and adjuvant (as defined in the group scheme above) as explanatory factors.

Gate keepers:

Group 7: serves as a negative control group for the experiment

Group 9: serves as a positive control group for the experiment

The level of RSV neutralizing Ab titers as determined by VNA on serum samples collected at day 49, will be used as primary outcome parameter.

The experiment will be considered valid if group 9 shows significantly higher RSV neutralizing Ab titers than Group 7 in serum collected at day 49 after immunization.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Power calculation.

Since this is the first study in which the effect of prime- boost immunization with PRPM-CHO protein (Groups 1-6) and with a prime immunization with Ad35.Fdcp (Group 8) is performed in guinea pigs, no exact power calculation for the size of the treatment or the control groups (Groups 7 and 9) can be performed. Data obtained in this study will be used for power calculations for future experiments. As an estimation, using a power analysis assuming continuous, normally distributed results, based on $\alpha=0.05$, power=0.8 and SD of 4 and a difference between groups of 6 (log2 transformed VNA titers), the required group size is estimated to be 7 ($N=2*(2.8*SD/(mean1-mean2))^2$).

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Species: Outbred SPF female guinea pigs (Dunkin Hartley strain). For justification of this animal model see refinement in D.

Origin: registered breeder.

Life stage: 6-8 weeks of age at the start of the study.

This part of the study will be performed with females, since the outcome of this study will be used to assess transplacental transfer of maternal antibodies to pups in future studies. The life stage is chosen since future studies will require the use of female guinea pigs that are capable to reproduce.

Estimated numbers: a maximum of 63 animals (9 groups of 7 animals).

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: This study is designed to generate immunogenicity profiles of vaccine preparation that are to be used in future studies in which transplacental transfer of maternal antibodies will be assessed. Therefore, the immunogenicity needs to be assessed in the same animal model, the guinea pig. There is no in vitro system available that allows immunogenicity assessment of vaccine preparations.

Refinement: the guinea pig was chosen as an animal model because the results of this study will be used

to design a future study in which the influence of maternally derived antibodies on the immunogenicity and efficacy of candidate RSV vaccines will be addressed, the ultimate goal of the Sponsor. Trans-placental transfer of maternal antibodies in guinea pigs is similar to that in humans (Borghesi, Open J. of Anim. Sciences, 2014). These features, including the guinea pig's reproductive characteristics and susceptibility to RSV (Buraphacheep, JID, 1997) makes this the model of choice to perform the study described in this proposal, and also limits the use to female animals only.
Reduction: statistical analysis provided in section A ensures maximum likelihood of significant results using a minimum number of animals.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

1) The animals will be housed in groups, in specific cages that include enrichment assets. Throughout the study, the animals will be observed daily to assess their general health status. Sampling and administration procedures are performed by qualified personnel and under anaesthesia to minimize discomfort and stress.

2) The experiment will be performed under DM-I conditions, except for animals that receive Adenovector and/or RSV preparations, which will be housed under DM-II conditions after administration of these preparations. All procedures will be performed in DM-I or DM-II equipment/facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Sampling and administration procedures are performed by qualified personnel and under anaesthesia to minimize discomfort and stress.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

In the animals that will be challenged with RSV, mild transient respiratory symptoms may be observed.

Explain why these effects may emerge.

Mild, transient respiratory symptoms may occur because of the RSV infection.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Throughout the study, the animals will be observed daily for their general health status. Animals will be weighed weekly, when there is an indication for weight loss, weighing will be done daily. Humane endpoints are defined.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

- The animal does not drink or eat anymore
- Reduction of body weight greater than 20% compared to the initial weight
- More than moderate circulation or respiratory issues
- Behaviour and movements of the animal are more than moderately deviating from routine

Indicate the likely incidence.

Not very likely as clinical symptoms arising because of RSV infection are uncommon and not considered lethal in this model.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Sampling of blood under anaesthesia: mild

Sampling of blood and administration of immunogens under anaesthesia: mild

Symptoms due to infection with RSV: moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

At the end of the study the animals will be euthanised as they will not be useful/suitable for other studies/purposes.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

██████████
Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD905002015154

Bijlagen

2

Datum 21-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ██████████,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 juli 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002015154. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 90500
Naam instelling of organisatie: BioXpert BV
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 54838134
Straat en huisnummer: Nistelrooise Baan 3
Postcode en plaats: 5374 RE SCHAIJK
IBAN: NL72RABO0183605888
Tenaamstelling van het rekeningnummer: BioXpert BV

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Viroclinics Biosciences B.V.
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: Viroclinics Biosciences B.V.
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: BioXpert
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 augustus 2015
Geplande einddatum: 31 juli 2016
Titel project: RSV-F protein and adenoviral vaccine immunogenicity in quinea pigs
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de potentie van een respiratoir syncytieel virus (RSV) F eiwit vaccin en een Adenoviraal RSV-F om antistoffen op te wekken tegen RSV in jong volwassen cavia's.
Naam DEC: DEC Leiden
E-mailadres DEC:

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:

Vergunninghouder

Plaats:

Schaijk

Datum:

23 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3
5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD905002015154

Bijlagen

2

Datum 21-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 21 juli 2015

Vervaldatum: 20 augustus 2015

Factuurnummer: 201570154

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015154	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD905002015154
2. Titel van het project: RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs.
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar de potentie van een respiratoir syncytieel virus (RSV) F eiwit vaccin en een Adenoviraal RSV-F vaccin om antistoffen op te wekken tegen RSV in jong volwassen cavia's.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon:
[REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 24-06-2015
 - aanvraag compleet: 06-07-2015
 - in vergadering besproken: 02-07-2015
 - anderszins behandeld: aanvullende informatie is via e-mail ronde besproken.
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 06-07-2015
 - advies aan CCD: 17-07-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - N.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 03-07-2015

- Strekking van de vragen: De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de controle groepen, het ongerief en de berekening.
 - Datum antwoord: 06-07-2015
 - Strekking van de antwoorden: de aanvraag is gecompliceerd.
 - Naar aanleiding van de vragen en suggesties van de DEC zijn het projectvoorstel en de NTS naar tevredenheid aangepast.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise: proefdiergeneeskundige praktijk
 - Deskundigheid expert: proefdierkundig adviseur met uitgebreide veterinaire ervaring.
 - Datum verzoek: 26-06-2015
 - Strekking van het verzoek: De DEC heeft gevraagd of de dodingsmethode en de toepassing van de anesthesie en analgesie volgens de Richtlijn zijn. De expert heeft dit bevestigd.
 - Datum expert advies: 02-07-2015

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - ✓ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
 - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
 - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord

- wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling te weten; het verkrijgen van inzicht in de werkzaamheid van nieuwe vaccins en vaccinconcepten, zoals het vaccineren van moeders ter bescherming van kinderen, tegen virale infecties met RSV. Dit wordt ingeschat als een substantieel belang. Jaarlijks sterven er meer dan 160.000 mensen aan de gevolgen van een RSV infectie. Meer inzicht draagt bij aan vermindering van ziekte- en sterfgevallen die het gevolg zijn van een virale infectie met RSV en de aanvraag dient daarmee een belangrijk maatschappelijk doel. Het wetenschappelijk belang wordt door de DEC substantieel geacht. Fundamenteel wetenschappelijke kennis van de immunogeniciteit van nieuw ontwikkelde RSV vaccins vormt de basis voor het ontwikkelen van antivirale interventie strategieën tegen RSV en is van essentieel belang voor verder onderzoek naar transplacentale overdracht van RSV specifieke maternale antistoffen. De DEC erkent dat er ook partijen zijn die een ander standpunt hebben met betrekking tot het ontwikkelen van vaccins. Deze belangen acht de DEC echter beperkt en wegen volgens de DEC niet op tegen het grote wetenschappelijk en maatschappelijk belang. De DEC onderschrijft dat, gezien de commerciële aard van de instelling, er een beperkt financieel belang is. Dit is volgens de DEC echter ondergeschikt aan het wetenschappelijke en maatschappelijk belang.
4. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
6. Het ongerief gepaard gaande met de technische handelingen waaraan het dier wordt onderworpen, wordt als gering ongerief ingeschat. In sommige gevallen kan er sprake zijn van matig ongerief als gevolg van de mogelijke bijwerkingen van de vaccinatie. Het cumulatieve ongerief wordt daarom door

de DEC als matig ingeschat, welk overeenkomt met het niveau van cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

7. In het project wordt de keuze voor het diermodel duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren zijn dieren die het minst gevoelig zijn voor pijn, lijden, angst of blijvende schade en de desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Naar het oordeel van de DEC zijn er geen alternatieven beschikbaar voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Ondanks dat er geen exacte powerberekening kan worden uitgevoerd acht de DEC het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt
9. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de verfijning van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

Het fundamenteel wetenschappelijke onderzoek in dit project is van substantieel belang en van aangetoonde excellente kwaliteit. De DEC is van mening dat de resultaten zullen bijdragen aan het verkrijgen van meer kennis van de immunogeniciteit van nieuw ontwikkelde RSV vaccins en een beter wetenschappelijk inzicht in de werkzaamheid van nieuwe vaccins en vaccinconcepten tegen virale infecties met RSV. De DEC acht het belang van de fundamenteel wetenschappelijke doelstelling substantieel en schat de kans op het realiseren van de doelstellingen in als hoog. De verkregen fundamenteel wetenschappelijke kennis is essentieel voor verder onderzoek naar transplacentale overdracht van RSV specifieke maternale antistoffen. Het maatschappelijk belang is daarmee groot.

De onderzoeksgroep beschikt over een ruime ervaring met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde typen dierproeven.

Bij de uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende licht tot matig ongerief bij de dieren gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens een ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden

✓ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen**

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.
t.a.v. [REDACTED]
Nistelrooise Baan 3
5374RE Schaijk

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproe
ven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD905002015154

Uw referentie

-

Bijlagen

1

Datum 10 augustus 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 18 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs" met aanvraagnummer AVD905002015154. In uw aanvraag zitten voor mij nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Onduidelijkheden

In uw aanvraag worden de humane eindpunten als volgt beschreven:

- The animal does not drink or eat anymore
- Reduction of body weight greater than 20% compared to the initial weight
- More than moderate circulation or respiratory issues
- Behaviour and movements of the animal are more than moderately deviating from routine.

Het exacte punt waarop deze eindpunten bereikt worden is niet duidelijk gesteld in deze beschrijving. Bijvoorbeeld, hoe lang moet een dier niet meer eten/drinken alvorens men ingrijpt? Hoe wordt bepaald of een dier niet meer eet/drinkt, aangezien de dieren in groepen gehuisvest zijn? Wat betreft de afname in lichaamsgewicht moet genoemd worden dat cavia's na 6-8 weken nog doorgroeien en een afname van 20% van het initiële lichaamsgewicht is dus een drastische afname ten opzichte van het te verwachten gewicht in de loop van de studie. Ook het derde en vierde humane eindpunt geven niet een duidelijke interpretatie-vrije omschrijving van het eindpunt.

Graag ontvangen wij een heldere omschrijving van de humane eindpunten zodat op de werkvloer geen interpretatieverschillen kunnen optreden.

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

Zodra wij de aanvullende informatie hebben ontvangen nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Zodra de leges zijn ontvangen, krijgt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

Datum

10 augustus 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD905002015154

Aan: IvD BioXpert, CCD

Betreft Aanvullende informatie onderzoeksplan getiteld: RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs. (CCD nr: AVD905002015154).

Datum: 11 augustus 2015

Beste leden van de IvD / Geachte leden van de CCD,

Met referentie naar uw verzoek om aanvullende informatie ontvangen op 10 augustus 2015 stuur ik u hierbij mijn antwoord op de vraag gesteld in uw schrijven.

Vraag:

In uw aanvraag worden de humane eindpunten als volgt beschreven:

- The animal does not drink or eat anymore
- Reduction of body weight greater than 20% compared to the initial weight
- More than moderate circulation and / or respiratory issues
- Behaviour and movements of the animal are more than moderately deviating from routine.

Het exacte punt waarop deze eindpunten bereikt worden is niet duidelijk gesteld in deze beschrijving. Bijvoorbeeld, hoe lang moet een dier niet meer eten/drinken alvorens men ingrijpt? Hoe wordt bepaald of een dier niet meer eet/drinkt, aangezien de dieren in groepen gehuisvest zijn? Wat betreft de afname in lichaamsgewicht moet genoemd worden dat cavia's na 6-8 weken nog doorgroeien en een afname van 20% van het initiële lichaamsgewicht is dus een drastische afname ten opzichte van het te verwachten gewicht in de loop van de studie.

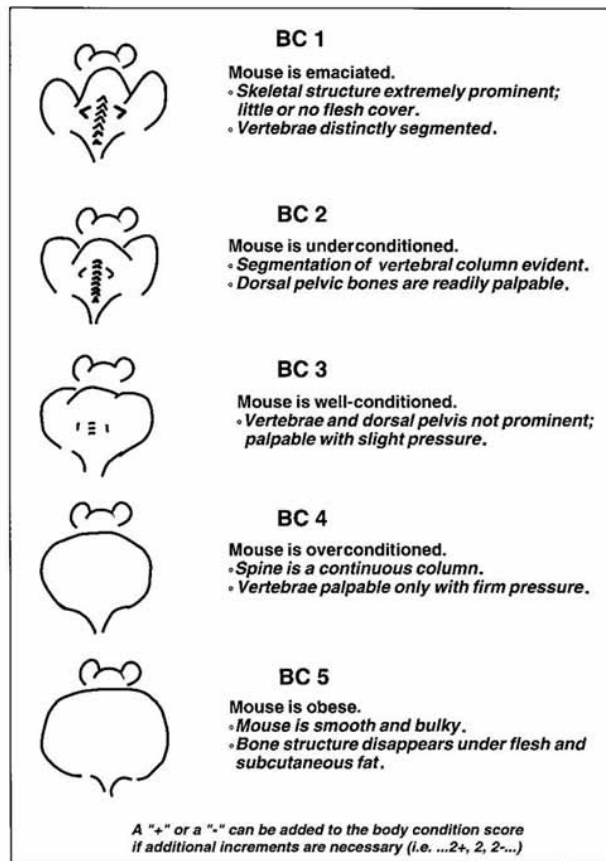
Ook het derde en vierde humane eindpunt geven niet een duidelijke interpretatie-vrije omschrijving van het eindpunt.

Antwoord:

We realiseren ons inderdaad dat de humane eindpunten zoals ze op dit moment omschreven zijn in het formulier "Description animal procedures" te veel ruimte openlaten voor vrije interpretatie. Bijgevoegd is een nieuwe versie van het formulier met daarin een aangepaste (punt 1 en 2, voor de duidelijkheid nu gecombineerd tot 1 punt) en voor de punten punt 3 en 4 een aangepaste omschrijving van deze humane eindpunten zodat op de werkvloer geen interpretatieverschillen kunnen optreden. De aangepaste tekst van 2J is hieronder afgedrukt. Tevens is het volgende kopje in het formulier enigszins aangepast (likelijkheid of symptoms).

In general, no abnormalities are expected during the study other than mild respiratory symptoms due to the RSV infection of group 9 as characterised by slightly elevated respiratory rate during the first two weeks after infection after which the respiratory rate should have normalised. If these respiratory symptoms aggravate, as characterized by labored breathing, the respective animal will be euthanised.

The following more general humane endpoints during the course of the study will be used to prevent further distress. The animals will be observed daily to assess the total body scores with respect to overall condition and the overall performance of the animals (see figure below). If the body condition scoring deviates from normal (BC3), this will be registered for the respective animal and this animal is monitored more frequently. Animals displaying a body condition score of 2 or lower in combination with one of the humane endpoint mentioned below will be euthanised.



- Reduction of body weight greater than 20% compared to normal body weight adjusted for age (see table below according supplier Harlan laboratories) animals are not expected to grow much more after 13 weeks of age:

Week 6	Week 7	Week 8	Week 9	Week 10	Week 11	Week 12	Week 13 and onwards
410	460	500	540	580	620	650	680

Animals are weighted every week. If the body weight stagnates or decreases slightly (<5%) in two consecutive weekly measurements, the animal is weighted more frequently. If the body weight continues to stagnate or decrease or if the body weight decreases between two measurements with 5-10% the animal is housed solitary to monitor the respective animal more closely with regards to food and water intake. The food intake is monitored by weighing back the food pellets and the water intake by checking the water level in the bottle. Furthermore the overall body score will be assessed including condition of the skin.

- More than moderate circulation issues as characterized by pale or cyanotic ears as an indication of poor blood circulation. Since RSV infection will not spread systemically in this model, these symptoms are not expected. If they do occur the colour of the ears is compared to a colour guide. The respiratory symptoms are described above.
- Behaviour and movements of the animal are more than moderately deviating from routine as characterized by excessive grooming, constant hiding, loss of balance, limping or hopping or ultimately lethargy as observed during daily checks as mentioned above.

Ik hoop u hiermede voldoende te hebben geïnformeerd om de beoordeling van dit projectvoorstel af te ronden.

Met vriendelijke groeten,

[Redacted signature block]

Viroclinics Biosciences B.V.
Rotterdam Science Tower
Marconistraat 16
3028 AK Rotterdam
Tel. [Redacted]
Mob. [Redacted]



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 90500
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. BioXpert
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 1 | RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The Sponsor of the study is aiming to develop a RSV vaccine for prevention of RSV infections in young children.

The study is performed to assess the in vivo immunogenicity in guinea pigs of a) a recombinant PRPM.CHO protein when used as a prime-boost immunization and b) an Adenovector driving expression of RSV F. The PRPM.CHO protein is produced in CHO cells and is a processed variant of the pre-fusion RSV-A2 F protein, containing quintuple (5) mutations.

The concrete objectives of the study are the following:

1. Immunogenicity of different doses of the PRPM.CHO RSV F derived protein in guinea pigs in a prime boost regimen, delivered with and without AdjuPhos.
2. Immunogenicity of an Ad35 vector containing the insert of the RSV F protein in guinea pigs.

The level of RSV neutralizing Ab titers as determined by VNA on serum samples collected at day 49, will be used as primary outcome parameter. The results will be used to determine the most optimal prime-boost regimen to assess transplacental transfer of RSV specific maternal antibodies to pups in future studies, which will be subject of another project proposal to be completed after conclusion of this study.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

The study is designed to evaluate the immunogenicity of various doses of the PRPM.CHO protein with and without adjuvation with AdjuPhos (Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark), in a prime-boost regimen in guinea pigs. Increasing protein doses will be used (0.5, 5 and 25µg per vaccination; groups 1 to 3 and 4 to 6) to determine the immunogenicity. Groups with and without AdjuPhos will be used to

determine the immunostimulatory effect of a licensed adjuvant (AdjuPhos) for this protein vaccine preparation (groups 1 to 3 vs. groups 4 to 6). For adjuvation of antigen two different kinds of adjuvant can be used: negatively (e.g. AdjuPhos) or positively (e.g. Alhydrogel) charged. Choice of the adjuvant will depend on the charge of the antigen. In this case the antigen is positively charged, therefore the negatively charged AdjuPhos will be used. This adjuvant has been shown to be effective without the occurrence of adverse effects in several preclinical models, including mice, cattle, and macaques (de Swart, J. Virol, 2002; de Waal, Vaccine, 2004; Kateregga, BMC Vet Res, 2012). Moreover, to determine the immunogenicity of a high dose of Adenovector with an RSV F gene insert (Ad35.Fdcp) will be evaluated (group 8, prime only).

The animals will be vaccinated intramuscularly (i.m.) at day 0 (prime) and day 35 (boost) after which the immune response is studied for 42 days (6 weeks).

The maximum volume to be applied i.m. will not exceed 0.1 ml per injection site with a maximum of two injection sites/inoculation.

During the experiment blood will be collected from the animals at days 0 (pre vaccination), 28, 35, 49 and 63. Collection of blood (from the vena cava cranialis) and administration of prime and boost formulations will be performed under isoflurane anesthesia. The blood collection volumes will not exceed 8 ml/kg/28 days. On day 77 all animals are euthanized by exsanguination under isoflurane anesthesia, followed by a lethal sodium pentobarbital dose.

In the experiment two control groups are included in which the animals are either i.m. injected with PBS (day 0 and day 35, negative control, group 7), or primed at day 0 with a high dose (10^5 PFU/animal) of RSV-A2 intranasally (positive control, induction of F protein specific immune responses in the context of a natural infection, group 9).

Groups and administration specifics are given below:

Group	Prime		Boost		n=	adjuvant	route
	Item	Dose	Item	Dose			
1	PRPM	0.5 µg	PRPM	0.5 µg	7	AdjuPhos	i.m.
2	PRPM	5 µg	PRPM	5 µg	7	AdjuPhos	i.m.
3	PRPM	25 µg	PRPM	25 µg	7	AdjuPhos	i.m.
4	PRPM	0.5 µg	PRPM	0.5 µg	7	-	i.m.
5	PRPM	5 µg	PRPM	5 µg	7	-	i.m.
6	PRPM	25 µg	PRPM	25 µg	7	-	i.m.
7	PBS	-	PBS	-	7	-	i.m.
8	Ad35.Fdcp	10^{10} vp	-	-	7	-	i.m.
9	RSV-A2	10^5 pfu	-	-	7	-	i.n.

During the study the animals will be observed daily for general health checks, morbidity and mortality. Bodyweights will be determined at the start of the study, and once every week during the duration of the experiment.

Using the blood samples collected on the days mentioned above, the immunogenicity of the various formulations will be assessed by serological analysis in an RSV specific virus neutralization assay.

Data analysis

The primary aim of the experiment is to explore the dose response of the adjuvanted and non-adjuvanted PRPM.CHO, a recombinant RSV-A derived F protein, in guinea pigs. Furthermore, immunogenicity of an Ad35 vector containing the insert of the RSV F protein will be evaluated. As an exploratory analysis, the mean VNA titer (\log_2) and the standard deviation will be calculated for each group.

Immune responses on days 28, 35, 49, 63 and 77 will be evaluated by comparing VNA titers in Groups 1-6 and 8 with Group 7. Since it is expected that all animals of Group 7 will have Ab titers at the lower limit of quantification (LLOQ), a Wilcoxon Rank Sum test will be used for these comparisons and a Bonferroni correction for multiple testing will be applied. The consecutive serum samples will be used to

assess the kinetics of RSV neutralizing antibody development, i.e. sera obtained on days 63 and 77 will provide information on the longevity of the antibody response.

The effect of AdjuPhos on the immune responses will be determined by comparing Groups 1-3 with Groups 4-6 across doses. An analysis-of-variance for potentially censored measurements will be applied to the log₂-transformed VNA titres. The statistical model contains dose and adjuvant (as defined in the group scheme above) as explanatory factors.

Gate keepers:

Group 7: serves as a negative control group for the experiment

Group 9: serves as a positive control group for the experiment

The level of RSV neutralizing Ab titers as determined by VNA on serum samples collected at day 49, will be used as primary outcome parameter.

The experiment will be considered valid if group 9 shows significantly higher RSV neutralizing Ab titers than Group 7 in serum collected at day 49 after immunization.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

Power calculation.

Since this is the first study in which the effect of prime- boost immunization with PRPM-CHO protein (Groups 1-6) and with a prime immunization with Ad35.Fdcp (Group 8) is performed in guinea pigs, no exact power calculation for the size of the treatment or the control groups (Groups 7 and 9) can be performed. Data obtained in this study will be used for power calculations for future experiments. As an estimation, using a power analysis assuming continuous, normally distributed results, based on $\alpha=0.05$, power=0.8 and SD of 4 and a difference between groups of 6 (log₂ transformed VNA titers), the required group size is estimated to be 7 ($N=2*(2.8*SD/(mean1-mean2))^2$).

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Species: Outbred SPF female guinea pigs (Dunkin Hartley strain). For justification of this animal model see refinement in D.

Origin: registered breeder.

Life stage: 6-8 weeks of age at the start of the study.

This part of the study will be performed with females, since the outcome of this study will be used to assess transplacental transfer of maternal antibodies to pups in future studies. The life stage is chosen since future studies will require the use of female guinea pigs that are capable to reproduce.

Estimated numbers: a maximum of 63 animals (9 groups of 7 animals).

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: This study is designed to generate immunogenicity profiles of vaccine preparation that are to be used in future studies in which transplacental transfer of maternal antibodies will be assessed.

Therefore, the immunogenicity needs to be assessed in the same animal model, the guinea pig. There is no in vitro system available that allows immunogenicity assessment of vaccine preparations.

Refinement: the guinea pig was chosen as an animal model because the results of this study will be used

to design a future study in which the influence of maternally derived antibodies on the immunogenicity and efficacy of candidate RSV vaccines will be addressed, the ultimate goal of the Sponsor. Trans-placental transfer of maternal antibodies in guinea pigs is similar to that in humans (Borghesi, Open J. of Anim. Sciences, 2014). These features, including the guinea pig's reproductive characteristics and susceptibility to RSV (Buraphacheep, JID, 1997) makes this the model of choice to perform the study described in this proposal, and also limits the use to female animals only.

Reduction: statistical analysis provided in section A ensures maximum likelihood of significant results using a minimum number of animals.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

1) The animals will be housed in groups, in specific cages that include enrichment assets. Throughout the study, the animals will be observed daily to assess their general health status. Sampling and administration procedures are performed by qualified personnel and under anaesthesia to minimize discomfort and stress.

2) The experiment will be performed under DM-I conditions, except for animals that receive Adenovector and/or RSV preparations, which will be housed under DM-II conditions after administration of these preparations. All procedures will be performed in DM-I or DM-II equipment/facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Sampling and administration procedures are performed by qualified personnel and under anaesthesia to minimize discomfort and stress.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

In the animals that will be challenged with RSV, mild transient respiratory symptoms may be observed.

Explain why these effects may emerge.

Mild, transient respiratory symptoms may occur because of the RSV infection.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

Throughout the study, the animals will be observed daily for their general health status. Animals will be weighed weekly, when there is an indication for weight loss, weighing will be done daily. Humane endpoints are defined.

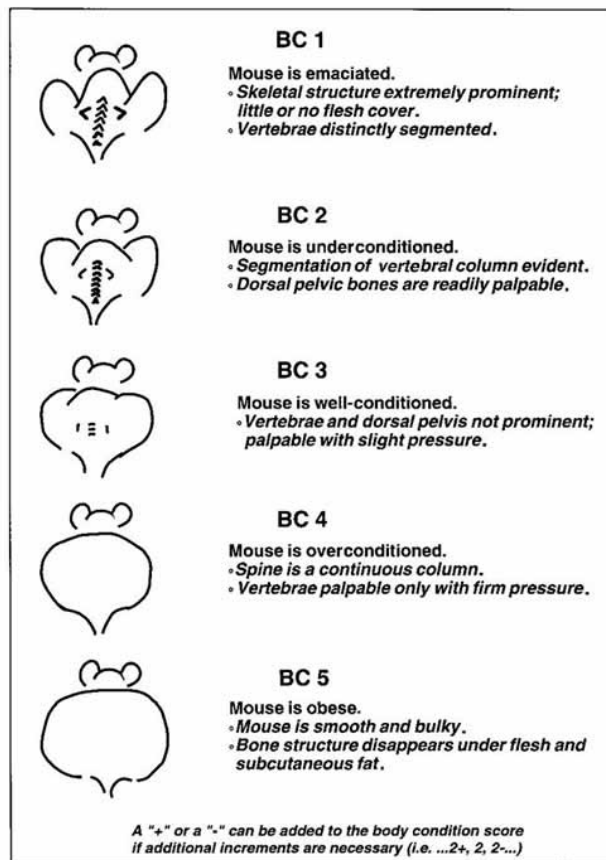
J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

In general, no abnormalities are expected during the study other than mild respiratory symptoms due to the RSV infection of group 9 as characterised by slightly elevated respiratory rate during the first two weeks after infection after which the respiratory rate should have normalised. If these respiratory symptoms aggravate, as characterized by labored breathing, the respective animal will be euthanised. The following more general humane endpoints during the course of the study will be used to prevent further distress. The animals will be observed daily to assess the total body scores with respect to overall condition and the overall performance of the animals (see figure below). If the body condition scoring deviates from normal (BC3), this will be registered for the respective animal and this animal is monitored more frequently. Animals displaying a body condition score of 2 or lower in combination with one of the humane endpoint mentioned below will be euthanised.



- Reduction of body weight greater than 20% compared to normal body weight adjusted for age (see table below according supplier Harlan Laboratories) animals are not expected to grow much more after 13 weeks of age:

Week 6	Week 7	Week 8	Week 9	Week 10	Week 11	Week 12	Week 13 and onwards
410	460	500	540	580	620	650	680

Animals are weighted every week. If the body weight stagnates or decreases slightly (<5%) in two consecutive weekly measurements, the animal is weighted more frequently. If the body weight continues to stagnate or decrease or if the body weight decreases between two measurements with 5-10% the animal is housed solitary to monitor the respective animal more closely with regards to food and water intake. The food intake is monitored by weighing back the food pellets and the water intake by checking the water level in the bottle. Furthermore the overall body score will be assessed including condition of the skin.

- More than moderate circulation issues as characterized by pale or cyanotic ears as an indication of poor blood circulation. Since RSV infection will not spread systemically in this model, these symptoms are not expected. If they do occur the colour of the ears is compared to a colour guide. The respiratory symptoms are described above.

Behaviour and movements of the animal are more than moderately deviating from routine as characterized by excessive grooming, constant hiding, loss of balance, limping or hopping or ultimately lethargy as observed during daily checks as mentioned above.

Indicate the likely incidence.

Not very likely as clinical symptoms arising because of RSV infection or the to be used preparations are uncommon and not considered lethal in this model.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

Sampling of blood under anaesthesia: mild

Sampling of blood and administration of immunogens under anaesthesia: mild

Symptoms due to infection with RSV: moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

At the end of the study the animals will be euthanised as they will not be useful/suitable for other studies/purposes.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



10.

Centrale Commissie Dierproeven i.o.

Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|-------------|--------------|
| Naam aanvrager | BioXpert BV | |
| Postcode | 5374RE | Huisnummer 3 |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|-----------------|
| Aanvraagnummer | AVD905002015154 |
|----------------|-----------------|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | |
|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> brief onderzoeker met antwoorden |
| <input checked="" type="checkbox"/> description animal procedures |
| <input checked="" type="checkbox"/> begeleidende brief vergunninghouder |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | |
|--------------|----------------|
| Naam | [Redacted] |
| Datum | 14 - 08 - 2015 |
| Handtekening | [Redacted] |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

**Centrale Commissie Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

Ref nr: Aanvraagnummer AVD905002015154
Betref: Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven
Cc: [REDACTED]

Schaijk, 14 augustus 2015

Geachte Commissie Dierproeven,

Op 10 augustus 2015 ontving ik uw verzoek om aanvullende informatie bij onze projektaanvraag "RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs" met aanvraagnummer AVD905002015154. In onze aanvraag zaten voor u nog enkele onduidelijkheden.

Ik heb de verantwoordelijk onderzoeker verzocht de gevraagde informatie helder en leesbaar aan te leveren. Deze informatie is door onze IvD beoordeeld en de IvD heeft mij geadviseerd de informatie naar u door te sturen, omdat zij van oordeel is dat nu passende en werkbare humane eindpunten zijn opgenomen zodat op de werkvloer geen interpretatieverschillen kunnen optreden.

De leges zijn per direct betaald, dat is door de vakantieperiode een ommissie van onze kant. Omdat de aanvraag echter al wel in behandeling is genomen, vraag ik coulance voor de doorlooptijd met het vriendelijk verzoek de gestelde termijn van 40 dagen vanaf indienen van de aanvraag op 18 juli te hanteren.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]
Vergunninghouder BioXpert B.V.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

[REDACTED]
Nistelrooise Baan 3
5374 RE Schaijk

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015154

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum 14 augustus 2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 18 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs" met aanvraagnummer AVD905002015154. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 augustus 2015 heeft u uw aanvraag gewijzigd op basis van door de CCD gestelde vraag betreffende humane eindpunten.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs" starten. De vergunning wordt afgegeven van 14 augustus 2015 tot en met 31 juli 2016.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 juli 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze gegevens in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

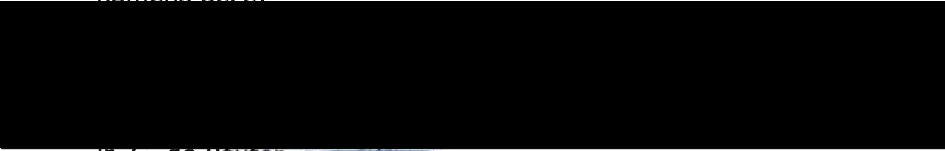
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

- Hiervan deel uitmakend:
- DEC-advies
 - Weergave wet- en regelgeving



Datum
14 augustus 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015154

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: BioXpert B.V.
Adres: Nistelrooise Baan 3
Postcode en woonplaats: 5374RE Schaijk
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 augustus 2015 tot en met 31 juli 2016, voor het project "RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs" met aanvraagnummer AVD905002015154, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 juli 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 juli 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 juli 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 18 juli 2015
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 augustus 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs	Cavia	63	56 dieren licht 7 dieren matig	-

Voorwaarden

-

Datum
14 augustus 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015154

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onvereenbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts

Datum
14 augustus 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015154

of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.