

| Inventaris Wob-verzoek W15-12 | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
| | NTS 2015159 | | | | | | | | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | |
| 2 | Niet-technische samenvatting | x | | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | | x | | | x | |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven 1 | | | | x | | | x | |
| 5 | Bijlage beschrijving dierproeven 2 | | | | x | | | x | |
| 6 | Bijlage beschrijving dierproeven 3 | | | | x | | | x | |
| 7 | Bijlage beschrijving dierproeven 4 | | | | x | | | x | |
| 8 | Bijlage beschrijving dierproeven 5 | | | | x | | | x | |
| 9 | DEC-advies | | | | x | | x | x | |
| 10 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | |
| 11 | Advies CCD | | x | | | | | | x |
| 12 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | |
| 13 | Mail beschikking 13-10-2015 | | | | x | | x | x | |
| 14 | Mail terugkoppeling DEC 14-10-2015 | | | | 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?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

Ja > Vul uw deelnemernummer in 90500 / 159
 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 |

- 1.4 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 | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |

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

| | | |
|-----------------------------|--|--|
| (Titel) Naam en voorletters | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | | |

- 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] Dhr. Mw.
- Functie [redacted]
- Afdeling [redacted]
- 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 - 7 - 2015
- Einddatum 1 - 7 - 2018
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Local delivery of testosterone and alendronate to aid bone (fracture) healing and to improve osseointegration of implants.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Plaatselijke afgifte van testosteron en alendronaat voor een sneller herstel van botbreuken en -defecten en voor het verbeteren van de verankering van botschroeven in bot.
- 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 [REDACTED]

Plaats Schaijk

Datum 3 - 7 - 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

Betreft: Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD905002015159

Geachte heer / mevrouw,

Bijgaand de getekende aanvraag Projectvergunning Dierproeven AVD905002015159 met als titel:

Local delivery of testosterone and alendronate to aid bone (fracture) healing and to improve osseointegration of implants..

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.

Bone tissue is one of the most frequently used tissues for transplantation. Annually more than two million patients are treated worldwide for skeletal complications in the field of orthopedic surgery, plastic surgery, maxillofacial surgery, and neurosurgery. The use of autologous bone grafts is still considered to

be the golden standard, but there are several major disadvantages associated with this technique, for example: low availability of the transplantable tissue, postoperative morbidity and lack of functional shape of the transplant. Moreover, bone graft surgery is considered a painful procedure and usually results in (significant) blood loss. Next to autologous bone grafts, synthetic and natural bone substituting materials are commercially available in granules, blocks or injectable formulations. These materials are based on calcium phosphates (hydroxyapatite) which resemble the bone mineral which only supports bone formation, but doesn't stimulate (induce) bone formation.

Furthermore, each year there are over 6 million bone fractures reported in the U.S. alone. Approximately one third of which require internal fixation devices to help facilitate healing. Despite the use of these devices about 10-15% of the fractures heal very poorly. The development of osteo-inductive medication to improve the healing of such fractures is therefore considered a high medical need. At present, insertion of metal implants in bone is one of the most common of all surgical procedures. It is part of fracture treatment, joint replacement, and dental surgery. The success of these operations is dependent of the fixation of the implants (osseo-integration), which depends on the strength of the bone that holds them. If the bone quality is poor, surgical procedures are modified to provide sufficient mechanical fixation by adding more screws or larger devices, or by protecting the implant from mechanical loading for a considerable postoperative time to allow bone integration. Thus, if the quality of the bone holding the implant could be improved locally, e.g. by coating implants with an osteo-inductive carrier, surgical procedures would become simpler and rehabilitation would become faster. Therefore, the development of bone inducing materials is a very relevant issue in bone (fracture) healing.

Currently, there are very few therapies available to enhance bone growth to improve bone (fracture) healing and/or to improve bone integration of implants. The only product currently available to replace autologous bone grafts is Infuse from Medtronic which is based on the use of BMP-2. Due to the high costs, limited efficacy and, more recently, reported adverse events, this product is not used in The Netherlands. Recently, Shah NJ et al. (PNAS, September 2014, 12847-12852) reported the use of a thin film loaded with growth factor BMP-2 and alendronate to successfully regenerate bone defects in a rat model. Clinical studies have not yet been initiated for this combination. Regarding the use of implants, only one company has developed an implant coated with a bisphosphonate to improve bone integration of implants. This product is currently under clinical evaluation and is pending market approval (AddBIO, Sweden).

Steroidal androgens activate bone forming cells and have shown positive effects on bone mineral density (BMD) and increase bone anabolic biomarkers in clinical trials. However, despite promising results systemic use of steroidal androgens is not approved because of safety concerns, particularly due to potential cardiovascular and blood-clotting issues, prostate stimulation in men and virilizing activity in women (e.g. hirsutism, voice change, and acne). Bisphosphonates are widely used for the treatment and prevention of postmenopausal osteoporosis and have shown to significantly reduce hip and vertebral fractures in clinical trials. Bisphosphonates have relatively low systemic exposure but a high affinity for bone mineral, thus concentrating their effects at localized regions of bone remodeling and inhibiting local osteoclast mediated bone resorption. Bisphosphonates only have a limited capacity to increase osteoblastic activity and may even inhibit bone formation at some sites. This inability to stimulate new bone formation limits the clinical benefit from bisphosphonates in patients with established bone loss where, hence, an anabolic agent would be desirable.

Considering the above, it is Osteo-Pharma's goal to develop an osteo-inductive carrier that is capable to locally enhance bone growth by simultaneously activating bone forming cells and inhibiting bone resorption cells. This will be achieved by **applying locally** a combination of a steroidal androgen (testosterone) and a bisphosphonate (alendronate) in that, due to the encapsulation in a biodegradable carrier, will be locally released to aid the bone regeneration process.

The concept of using both a steroidal androgen and a bisphosphonate has been tested in vitro at Osteo-Pharma e.g. using the mouse MC3T3 osteoblast cell line. The data obtained indicated stimulation of bone forming cells (osteoblasts) under influence of testosterone and inhibition of bone resorbing cells (osteoclasts) under influence of alendronate. Therefore, these studies indicate that our proposed combination therapy would be able to successfully accelerate bone (fracture) healing as well as to improve implant fixation. To our knowledge, no publications of a combined local treatment of both androgen and bisphosphonates in bone (fractures) have been reported. The next step will be to test the efficacy of this combination therapy in rat and rabbit animal models commonly used in bone fracture repair and for the study of (coated) implants.

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 aim of the current project is to provide a local treatment which aids the bone (fracture) healing process, including pathological, traumatic and complicated defects and fractures and to improve osseointegration of implants. The treatment will comprise of a biodegradable polymer with a combination of testosterone and alendronate for controlled and sustained release in films and microspheres or as a coating on dental and orthopedic screws. Therefore, in vivo experimental studies will be performed in established animal models for fracture repair and implants to evaluate testosterone and alendronate dosing combinations to optimize the amount of new bone formation by means of MicroCT, histology and biomarker analyses.

Our in vitro cell culture data suggest stimulation of bone forming cells (osteoblasts) under influence of testosterone and inhibition of bone resorbing cells (osteoclasts) under influence of alendronate. Therefore, these studies indicate that our proposed combination therapy would be able to successfully accelerate bone (fracture) healing as well as improve implant fixation in in vivo experimental studies.

3.3 Relevance

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

Currently, there are very few therapies available to enhance bone growth to improve fracture healing and/or to improve bone integration of implants. However, these require all very demanding therapy regimens and are cost intensive. Therefore, the medical relevance is to develop a novel therapy that can be used for treatment of bone defects and fractures, in particular to accelerate bone (fracture) healing. This novel therapy is less demanding for the patient, improves the quality of life and reduces healthcare costs.

3.4 Research strategy

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

The project will develop a carrier material loaded with a combination of testosterone and alendronate, to aid the bone (fracture) healing process and to improve osseointegration of implants. This formulation is tested for its in vitro release characteristics as well as in cell culture systems to study the effect on osteoblast and osteoclast activity. With these in vitro data an optimal concentration of both testosterone and alendronate can be determined to achieve maximum bone regeneration. Therefore, a proof-of-principle study in rats will be performed to investigate if the acquired in vitro data can be translated into an in vivo situation. A sub-periosteal cranial study in rats will be performed to examine changes in bone turn-over by films containing an low, medium or high dose of testosterone and alendronate. A sub-periosteal study is a less invasive method to examine changes in bone biomarkers compared to a critical sized cranial defect. The doses of alendronate and testosterone are based on literature studies and in vitro data. The medium (optimal) concentration will be chosen and a 5 times lower and higher concentration will be chosen. After this proof-of-principle study, the next step is to implant films loaded with the optimal testosterone and alendronate concentrations into critical-sized cranial bone defects. The rat is the smallest animal available in which a flat critical-sized bone defect can be created and has therefore been selected as the model for these experiments. In addition, the effect of a coating containing testosterone and alendronate will be evaluated on dental and orthopedic screws. These screws will be implanted in femoral condyles of New Zealand White rabbits. Finally, a bone substitute (Demineralized Bone Matrix mixed with microspheres) will be used as a carrier for testosterone and alendronate. These implants will be placed in femoral condyles of New Zealand White rabbits as well. Due to the dimensions of the screws and the required size of a bone defect, femoral condyles of rabbits are the smallest animal model before a dog to physically allow implantation of the screws and or to fill a defect.

The first study performed will be to test various concentrations of testosterone and alendronate in the sub-periosteal rat model to determine if the optimal concentrations are used for bone regeneration purposes. (Go/No-Go). Subsequently, the rat sub-periosteal cranial defect model will be tested and rabbit studies will be initiated. For the rabbit implant and bone defect studies, the experiments will start with healthy 12 weeks old animals and if successful (Go/No-Go) will be followed by studies in the

ovariectomized (osteoporosis) model. Prior to all animal studies extensive in vitro cell culture studies have been performed to as guide for dosages to be used in the animal trials. In addition, data available from the literature will incorporated. After conducting these animal studies, bone substitutes, films and coated screws can be used in dental and orthopedic clinical studies.

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.

First, a proof-of-principle study in rats will be performed to investigate if the acquired in vitro data can be translated into an in vivo situation. Therefore, a sub-periosteal cranial study in rats will be performed to examine changes in bone turn-over by films containing an low, medium or high dose of testosterone and alendronate. This will be monitored by detecting biomarkers (PINP and CTx) in blood and by in vivo MicroCT analyses on the bone formation. Before collecting blood from the rats, overnight food intake should be restricted due to interference with biomarker levels. After this proof-of-principle study, the next step is to implant films loaded with the optimal testosterone and alendronate concentrations into critical-sized cranial bone defects. Besides normal healthy female rats, ovariectomized (OVX) rats whose ovaries have been removed will be used. The ovariectomized rat is generally considered a validated model to represent the most important clinical features of estrogen deficiency-induced (or postmenopausal) bone loss in adult females. It is widely used for studies relating to the prevention and treatment of osteoporosis in general as well as studies relating to the healing of osteoporotic fractures as this disease occurs predominantly in females. Therefore, rats (half of them will be ovariectomized) will be examined on their bone regeneration potential in time by means of MicroCT and biomarkers (PINP and CTx) in blood. Also, histological analyses will be performed after the end of the implantation period. In all rat experimental studies the same animals in time will be monitored with MicroCT. Therefore, less animals are needed and also less variation in the results will be expected.

Furthermore, screws will be coated with the optimal amount of testosterone and alendronate. These screws will be implanted in femoral condyles of New Zealand White rabbits and will be evaluated in time by means of torque testing, MicroCT and after the end of the implantation period by histological analyses. Finally, a bone substitute (Deminerlized Bone Matrix mixed with microspheres) will be used as a carrier for testosterone and alendronate. These implants will be placed in femoral condyles of New Zealand White rabbits and will be evaluated in time by means of MicroCT and histological analysis on their bone tissue response.

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 coherence of the proposed animal experimental studies is to acquire, with an optimal concentration of both testosterone and alendronate, the optimal dose for bone regeneration. First, the efficacy of testosterone and alendronate will be determined in vivo with a sub-periosteal model in rats. These data will be the basis for subsequent studies in the rat and rabbit. With these data, critical-sized cranial defects will be treated with the optimal amount of testosterone and alendronate. Furthermore, coated screws will be implanted in femoral condyles of rabbits. Finally, a bone substitute will be implanted in femoral condyles of rabbits. If successful, these studies would qualify to be used in dental and orthopedic clinical studies.

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 | Bone marrow collection with test surgery and MicroCT scanning of Wistar rats |
| 2 | Sub-periostal cranial proof-of-principle study in Wistar rats |
| 3 | Critical-sized cranial defect in Wistar rats |
| 4 | Femoral condyle screw implantation in New Zealand White rabbits |
| 5 | Deminerlized Bone Matrix (DBM) mixed with testosterone and alendronate loaded microspheres implanted in rabbit femoral defects |
| 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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | Test surgery and MicroCT scanning of Wistar rats and bone marrow collection |
- 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.

Ten (twelve-week old) female Wistar rats will be used to practice the surgical procedures of the sub-periosteal and cranial defects. Furthermore, blood samples will be collected to set-up the biomarker analyses and in vivo MicroCT will be performed under terminal anesthesia to evaluate the optimal parameters to successfully acquire data within the following animal experiments. Finally, bone marrow will be collected for in vitro cell culture testing.

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

Ten (twelve-week old) female Wistar rats will be used by two technicians next to the principal investigator to practice the surgical procedures of the sub-periosteal and cranial defects. A successful operation means that the sinus (large bloodvessel) directly below the cranium will not be hit during surgery. This is followed directly by in vivo MicroCT scanning under terminal anesthesia to evaluate the optimal parameters to acquire a standardized greyscale (when is it bone or not) for the following animal experiments. This will be performed for all 10 rats. Furthermore, blood samples will be collected to set-up the biomarker analyses. Also, bone marrow will be collected for in vitro cell culture testing of osteoblasts and osteoclasts. Experience with cranial bone defects were gained in the past by the principal investigator. (Link et al., J Biomed Mater Res A. 2013 Nov;101(11):3059-65., J Biomed Mater Res A. 2009 Aug;90(2):372-9. & Biomaterials. 2006 Oct;27(28):4941-7. Both technicians have >5 year experience with working with rat and rabbit models for bone research at MSD/Organon (Gerrits et. al., J Bone Miner Res. 2011 Dec;26(12):2886-98 & Cui et al., Nat Med. 2011 Jun;17(6):684-91). Even though both principle investigator and technicians are skilled in these animal **models no studies** have been

performed in the last 5 years.

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

No statistical analysis is required to test the surgical procedures. It is estimated that the number of 10 rats would be sufficient to test the surgical procedures adequately and to reach the required level of competency.

B. The animals

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

Taking planned animal experiments in consideration, ten (twelve-week old) female Wistar rats will be used. A rat is the smallest animal available in which a flat critical-sized bone defect can be created. The age of a young adolescent has been chosen as these animals have reached their peak bone mass. Females are chosen because **one of the objectives is** to perform studies in an osteoporosis model that optimally mimics the human situation. These are generally not performed in male animals as osteoporosis predominantly occurs in women. **Such** a model will be **generated through ovariectomy (OVX)**. Once 50% loss of Bone Mineral Density (BMD) has been achieved (as determined by MicroCT analysis) the studies will be initiated.

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.

During the surgical procedures, anesthesia and analgesia will be applied to reduce the discomfort of the rats as much as possible. During MicroCT scanning anesthesia will also be applied.

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

Measures to minimise adverse effects before, during and after surgery will include heating pads to maintain the optimal body temperature of the rats.

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.

Surgery will be performed under general inhalation anesthesia. The anesthetics given (type, dosage, frequency) will be in consultation with the IvD.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

No long-term adverse effects on welfare are considered, since a continuous procedure under anesthesia within the same day will be performed. The rats will undergo a surgical procedure, meanwhile blood will be collected and consequently MicroCT scanning under terminal anesthesia will be performed.

Explain why these effects may emerge.

No long-term adverse effects on welfare are considered, since a continuous procedure under anesthesia within the same day will be performed. The rats will receive a surgical procedure, meanwhile blood will be collected and consequently MicroCT scanning under terminal anesthesia will be performed.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

No long-term adverse effects on welfare are considered, since a continuous procedure under anesthesia within the same day will be performed. The rats will receive a surgical procedure, meanwhile blood will be collected and consequently MicroCT scanning under terminal anesthesia will be performed.

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.

Indicate the likely incidence.

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').

Non-recovery.

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.

To optimize the use of these animals, additionally bone marrow of both femurs and tibias will be collected for in vitro cell culture testing of osteoblasts and osteoclasts.

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



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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 2 | Sub-periosteal cranial proof-of-principle study in Wistar rats |
- 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.

Twelve-week old female Wistar rats will be used to provide anabolic procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) and catabolic carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) biomarker data regarding the bone turnover during eight weeks in blood. Both biomarkers will appear in blood if new bone formation has occurred (PINP) or when bone resorption will take place (CTX) In this way, it will give supporting data regarding to bone turnover in time. Since direct bone formation will be measured with MicroCT and histology, biomarkers could serve as an important analyzing tool in future clinical trials, since MicroCT and histology in humans studies will not be possible.

Each rat will receive one film and all experimental groups consists of 3 films each (or no treatment as a neg. control or Parathyroid Hormone (PTH) injections, known to stimulate bone formation, as a pos. control. Blood will be obtained before the start of the surgery and after each two weeks during the implantation period of eight weeks. Specific ELISAs will be used to determine the serum levels of PINP and CTX. Besides these biomarkers, MicroCT data will be gathered before the start of the experiment and after two, four, six and eight weeks implantation period to assess the bone volume and bone mineral density.

| | Films containing testosterone (high) and alendronate (n=3) | Films containing testosterone (medium) and alendronate (n=3) | Films containing testosterone (low) and alendronate (n=3) | Only film (n=3) | No treatment (n=3) (Neg. control) | PTH treatment (n=3) (Pos. control) |
|------------|--|--|---|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Wistar rat | PINP, CTX and MicroCT (0, 2, 4, 6 and 8 weeks) | | | | | |

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

Surgery will be performed under general inhalation anesthesia. To minimize postoperative pain, appropriate analgesics will be administered preoperatively and postoperatively. All anesthetics and analgesics given (type, dosage, frequency) will be **decided on** in consultation with the IvD. After anesthesia, the rats will be immobilized on their abdomen, and the skull will be washed and disinfected with iodine. To minimize pain, lidocaine will be administered onto the periosteum before incision. A longitudinal incision will be made down to the periosteum from the nasal bone to the occipital protuberance, and soft tissues will be sharp dissected to visualize the cranial periosteum. Subsequently, a midline incision will be made in the periosteum, and the periosteum will be undermined and lifted off in left and right directions on the parietal skull. Consequently, films containing testosterone and alendronate will be placed in the subperiosteal space. The periosteum will be closed using resorbable Vicryl suture material. Subsequently, the skin will be closed using resorbable Vicryl sutures. To minimize postoperative discomfort, treatment with Temgesic will be continued for 2 days postoperatively. Also, the animals will be observed for weight(loss), signs of pain, infection, and proper activity. Blood sample collection of 0.5 ml from the tail vein and MicroCT scanning (under anesthesia) will be performed after the surgery and after 2, 4, 6 and 8 weeks of implantation. Since the release of testosterone and alendronate will be limited to eight weeks, no further blood samples will be collected. Therefore, the rats will be euthanized eight weeks after surgery by an overdose of CO₂/O₂.

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

In this proof-of-principle study eighteen Wistar rats will be used to evaluate if the proposed combination therapy of testosterone/alendronate can be translated into an in vivo situation. The optimal concentration will be tested next to a lower and higher concentration. These results will give an indication on the in vivo effect and if the biomarkers are measurable in blood. Therefore, an n=3 will be sufficient for this proof-of-principle study. Accordingly, these findings will be taken in consideration for the following large experimental study.

B. The animals

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

Eighteen (twelve-week old) female Wistar rats will be used. This study will be the pilot study for the next large critical-sized defect study. Therefore, the same animal species will be used as for the large critical-sized defect study. A rat is the smallest animal available in which a flat critical-sized bone defect can be created and is considered a well-established model for studying fracture repair. A mouse cranium would be too concave and would be technically challenging to operate (requires microsurgery). The age of a young adolescent has been chosen as these animals have reached their peak bone mass. Females are chosen because it also aimed to perform studies in an osteoporosis model that optimally mimics the human situation. These are generally not performed in male animals as osteoporosis predominantly occurs in women. By OVX such a model will be generated. Once 50% loss of BMD has been achieved (as determined by MicroCT analysis) the studies will be initiated.

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.

The films containing testosterone/alendronate were tested in in vitro cell culture studies. There, it was shown that these constructs were stimulating osteoblasts, while simultaneously inhibiting osteoclasts. Before we can test these constructs in clinical situations, it is necessary to prove in an animal model that these constructs would be a good alternative for current treatments. Bone turn-over and the behaviour of these films by exposing them into a complex environment can only be studied in animal models. In this study, rats are the lowest animal species in which we can examine the bone turn-over properly. The number of 3 rats per timepoint (18 rats in total) is sufficient for this proof-of-principle study. During the surgical procedures, anesthesia and analgesia is applied to reduce the discomfort of the rats as much as possible.

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

Preoperative antibiotic treatment will be given to significantly reduce, but not eliminate, the 5% risk of bacterial contamination during the surgical procedure. Aseptical techniques will be used. Still, if afterwards animals would visually suffer, for instance by >20% weight loss or show pilo-erection, then the animals can be withdrawn from the study. This will always be in consultation with bio-technicians and a veterinarian. If the responsible researchers, the laboratory animal experts and the veterinarian are not reachable, a veterinarian or bio-technician can withdraw the rats from the study without consultation.

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.

Surgery and MicroCT scanning (after surgery, 2, 4, 6 and 8 weeks) will be performed under general inhalation anesthesia. To minimize postoperative pain, appropriate analgesics will be administered preoperatively and postoperatively. All anesthetics and analgesics given (type, dosage, frequency) will be **decided on** in consultation with the IvD.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Possibly complications like infections or swelling could occur due to the surgical procedure, resulting in the suffering (anxiety, fear, loss of appetite) of the rats.

Explain why these effects may emerge.

Infections or swelling due to contaminants can't be completely eliminated from the operating theater. Despite all preventive microbiological procedures, even with preoperative antibiotic treatment, few (<5%) of all operations performed results in microbiological infections.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

The implanted constructs will be manufactured under GLP conditions. After producing the constructs, a final sterilization step will be performed to guarantee sterility. This will also be performed for all other equipment used in the surgical theatre. Therefore, micro-organisms will be reduced to a minimum in the surgical area.

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.

Preoperative antibiotic treatment will be given to significantly reduce, but not eliminate, the 5% risk of bacterial contamination during the surgical procedure. Still, if afterwards animals would visually suffer, for instance by >20% weight loss or show piloerection, then the animals can be withdrawn from the study. This will always be in consultation with bio-technicians and a veterinarian. If the responsible researchers, the laboratory animal experts and the veterinarian are not reachable, a veterinarian or bio-technician can withdraw the rats from the study without consultation.

Indicate the likely incidence.

5%

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').

Moderate discomfort due to surgery (exp. groups). Minor discomfort for the control groups.

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.

Samples and their surrounding tissue will be explanted for histological analysis. Therefore, rats will be euthanized.

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



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 BV | |
| 1.3 | List the serial number and type of animal procedure. | Serial number | Type of animal procedure |
| | | 3 | Critical-sized cranial defect in Wistar rats |

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.

Eighty twelve-week old female Wistar rats will be used to provide MicroCT and histological data of bone formation up to eight weeks. Half of these rats will be ovariectomized being eight-weeks old to mimic an osteoporotic environment. These OVX-rats will be used after 4 weeks of ovariectomy, only when their body mineral density (BMD) is reduced to 50%. Else an additional 2 weeks will be added until the 50% reduction is achieved. Consequently, implants consisting of collagen sponges covered with a film containing testosterone and alendronate will be placed in a critical-sized cranial defects. The collagen sponges will serve as a guiding template for bone regeneration, which were not needed in the proof-of-principle study, since there was no critical-sized defect present. Also, films and sponges will be separately implanted in critical-sized cranial defects next to empty defects as control. The central full thickness bone defect will be drilled with a hollow trephine drill with an outer diameter of 8.0 mm to ensure an standardized defect. Each rat will receive one implant of 8 mm in diameter and all groups consist of ten implants each. Blood will be obtained before the start of the surgery and after each two weeks during the implantation period of eight weeks. Specific ELISAs will be used to determine the serum levels of PINP and CTX. Both biomarkers will appear in blood if new bone formation has occurred (PINP) or when bone resorption will take place (CTX) In this way, it will give supporting data regarding to bone turnover in time, next to the MicroCT and histological data. Besides these biomarkers, MicroCT data will be gathered before the start of the experiment and after two, four, six and eight weeks implantation period. This will be combined with histological data after eight weeks to assess the bone volume and bone mineral density.

| | Collagen sponge with testosterone and alendronate film | Only film with testosterone and alendronate | Only collagen sponge | Empty defect |
|--------------------------------|---|---|----------------------|--------------|
| Wistar rats cranial defect | PINP, CTX and MicroCT (2, 4, 6 and 8 weeks) Histology (8 weeks) | | | |
| OVX-Wistar rats cranial defect | | | | |

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

To obtain ovariectomized rats, a small transverse peritoneal incision of 0.4-0.6 cm will be made with surgical scalpel on the middle part of the abdomen slightly towards right, just near to the second right nipple of the rat. The adipose tissue will be pulled away until the right uterine tube and the ovary surrounded by a variable amount of fat will be identified. The ovary and associated fat will be exteriorized by gentle retraction. The periovarian fat with the ovary will be pulled away from the incision site. After identifying the ovary and uterine horn, a suture will be performed around the area of the distal uterine horns, that will be sectioned thereafter, and the ovaries will be removed. The uterine horn is returned to the peritoneal cavity after the removal of ovaries. The wound will be closed in two layers (muscle and skin) using sterile Vicryl sutures. The procedure will be repeated for the left ovary through a similar kind of incision on the contralateral side. To minimize postoperative discomfort, analgesic treatment will be continued for 2 days postoperatively. Also, the animals will be observed for signs of pain, infection, and proper activity.

The critical-sized cranial defect surgery will be performed under general inhalation anesthesia. To minimize postoperative pain, appropriate analgesics will be administered preoperatively and postoperatively. All anesthetics and analgesics given (type, dosage, frequency) will be decided in consultation with the IvD. After anesthesia, the rats will be immobilized on their abdomen, and the skull will be washed and disinfected with iodine. To minimize pain, lidocaine will be administered onto the periosteum before incision. A longitudinal incision will be made down to the periosteum from the nasal bone to the occipital protuberance, and soft tissues will be sharp dissected to visualize the cranial periosteum. Subsequently, a midline incision will be made in the periosteum, and the periosteum will be undermined and lifted off in left and right directions on the parietal skull. To create a central full thickness bone defect in the parietal cranium, a hollow trephine drill with an outer diameter of 8.0 mm in a dental handpiece will be used. The bone defect will be carefully drilled under continuous cooling with physiologic saline, without damaging of the underlying dura. Then, the created bone segment will be carefully removed, without damaging the underlying sagittal sinus. Following insertion of collagen sponges covered with a film containing testosterone and alendronate, the periosteum will be closed using resorbable Vicryl suture material. Also, films and sponges will be separately implanted in critical-sized cranial defects next to empty defects as control. Subsequently, the skin will be closed using resorbable Vicryl sutures. To minimize postoperative discomfort, treatment with analgesics will be continued for 2 days postoperatively. Blood sample collection of 0.5 ml from the tail vein and MicroCT scanning (under anesthesia) will be performed after the surgery and after 2, 4, 6 and 8 weeks of implantation. Also, the animals will be observed for signs of pain, infection, and proper activity. The rats will be euthanized 8 weeks after surgery by an overdose of CO₂/O₂.

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

In this experimental study eighty Wistar rats in total will be used to evaluate if the proposed combination therapy of testosterone/alendronate can be translated into an orthotopic critical-sized defect. A Power analysis will be performed to determine the number of animals needed per experimental group to obtain statistically trustworthy data and that it would be implausible that the effect is based on chance. Therefore, an hypothesis will set with continuous variables, which ensures that no unnecessary high numbers of rats will be used. This formula is $n=1+2C(s/d)^2$ in which the C-value is calculated with the

power ($1-\beta$) and the wanted significance level (α). When two groups (experimental versus control) will be compared (with the power of 0.8 and a significance level of 0.05) it will result in a C-value of 7.85. A Bonferroni correction will be applied if more than two groups will be compared with each other. The s- and d- values represent the estimated standard deviation (s) (e.g. 0.7) and the expected difference between the experimental and control groups (e.g. 1). This would lead to an $n=8.69$ in this example. However, the actual values will be acquired from the previously performed proof-of-principle study of appendix 2. Based on literature an $n=10$ is a well-accepted number to achieve significant differences.

B. The animals

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

Eighty (twelve-week old) female Wistar rats will be used. This number is an estimate, since the appropriate number of rats will be determined with a power analysis based on the results of the proof-of-principle study of appendix 2.

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.

The constructs containing testosterone/alendronate films were tested in in vitro cell culture studies. There, it was shown that these constructs were stimulating osteoblasts, while simultaneously inhibiting osteoclasts. Before we can test these constructs in clinical situations, it is necessary to prove in an animal model that these constructs would be a good alternative for current treatments. Bone turn-over and the behavior of these films by exposing them into a complex environment can only be studied in animal models. Therefore, a dose-finding study will be performed (in experiment 2) and the following studies, including the current one, will be performed in phases to reduce the amount of animals as much as possible.

In this study, rats are the lowest animal species in which we can examine the bone turn-over properly. The amount of 10 rats per timepoint (80 rats in total) is sufficient for this experimental study. During the surgical procedures, anesthesia and analgesia is applied to reduce the discomfort of the rats as much as possible.

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

Preoperative antibiotic treatment will be given to significantly reduce, but not eliminate, the 5% risk of bacterial contamination during the surgical procedure. A-septical techniques will be used. Still, if afterwards animals would visually suffer, for instance by >20% weight loss or show pilo-erection, then the animals can be withdrawn from the study. This will always be in consultation with bio-technicians and a veterinarian. If the responsible researchers, the laboratory animal experts and the veterinarian are not reachable, a veterinarian or bio-technician can withdraw the rats from the study without consultation.

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.

Surgery and MicroCT scanning (after surgery, 2, 4, 6 and 8 weeks) will be performed under general inhalation anaesthesia. To minimize postoperative pain, appropriate analgesics will be administered preoperatively and postoperatively. All anesthetics and analgesics given (type, dosage, frequency) will be in consultation with the IvD.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Possibly complications like infections or swelling could occur due to the surgical procedure, resulting in the suffering (anxiety, fear, loss of appetite) of the rats.

Explain why these effects may emerge.

Infections or swelling due to contaminants can't be completely eliminated from the operating theatre. Despite, all preventive microbiological procedures, 5% of all operations performed results in microbiological infections.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

The implanted constructs will be manufactured under GLP conditions. After producing the constructs, a final sterilization step will be performed to guarantee sterility. This will also be performed for all other equipment used in the surgical theatre. Therefore, micro-organisms will be reduced to a minimum in the surgical area.

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.

Preoperative antibiotic treatment will be given to significantly reduce, but not eliminate, the 5% risk of bacterial contamination during the surgical procedure. Also, the sinus of the brain might be damaged during surgery, resulting in (significant) blood loss. If afterwards animals would visually suffer, for instance by >20% weight loss or show piloerection, then the animals can be withdrawn from the study. This will always be in consultation with bio-technicians and a veterinarian. If the responsible researchers, the laboratory animal experts and the veterinarian are not reachable, a veterinarian or bio-technician can withdraw the rats from the study without consultation.

Indicate the likely incidence.

5%.

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').

Moderate discomfort.

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.

Samples and their surrounding tissue will be explanted for histological analysis. Therefore, rats will be euthanized.

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



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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 4 | Femoral condyle screw implantation in New Zealand White rabbits |
- 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.

Twenty female New Zealand White rabbits (4-5 months) with a weight of approximately 3.5 kg will be used as experimental animals. Each rabbit will receive two screws in a trabecular bone defect as created in the left medial and right medial distal femur. In this way, forty implants will be inserted in twenty rabbits, divided into 2 experimental groups with 2 timepoints (6 and 12 weeks). All screws will receive the same manufacturing treatment, were half of the screws will contain testosterone and alendronate in their coating, while the control screws will have a blank coating. After three, six and nine weeks fluorochromes will be injected to be deposited into the matrix to visualize bone formation in time. Torque testing, MicroCT and histology will be performed after six and twelve weeks of implantation ex vivo to evaluate the screw anchoring and bone tissue response.

| | Screws containing testosterone and alendronate | Only screws |
|---------------------------|---|-------------|
| New Zealand White Rabbits | Torque testing, MicroCT and Histology (6, and 12 weeks) | |

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

Surgery will be performed under general inhalation anesthesia. Anesthesia will be induced by an intravenous injection of Propofol and atropine, and will be maintained by ketamine/medetomidine. The anesthesia will be antagonised after surgery by Antisedan. To reduce the peri-operative infection risk, the rabbits will receive antibiotic prophylaxis (Baytril 2.5% (enrofloxacin), 5–10 mg/kg). During anesthesia, the rabbits will be immobilized on their back and the surgical areas will be shaved and disinfected with povidone-iodine. A longitudinal incision will be made down to the periosteum. Subsequently, a midline incision will be created in the periosteum. The periosteum will be undermined and lifted off the distal femora. With several burrs (with an increasing burr diameter) the defects in the femora will be drilled from the medial direction to obtain undersized cylindrical defects. After insertion of the screws, the periosteum and soft tissue will be closed using resorbable Vicryl sutures. During the implantation period, fluorochromes will be subcutaneously injected in the neck. Directly after surgery and at least two days post-operative, an NSAID (Metacam) will be given. The first injection of oxytetracycline (25 mg/kg) will be administered 3 weeks post-surgery, the mid label with alizarine complexon (30 mg/kg) will be injected 6 weeks post-surgery and the third and last label of calcein green (15 mg/kg) will be injected 9 weeks post-surgery. The rabbits will be euthanized after six and twelve weeks post-surgery by an overdose of sodium pentobarbital. Two timepoints are necessary to analyze the effect of bone formation in time and to what extent this would influence the mechanical properties (torque testing) Experience with (trabecular bone defects in) New Zealand White rabbits, including providing the animals antibiotics and final euthanasia, were gained in the past by the principal investigator. (Link et al. Biomaterials. 2008 Feb;29(6):675-82.)

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

In this experimental study twenty New Zealand White rabbits in total will be used to evaluate if the proposed combination therapy of testosterone/alendronate can be translated into an orthotopic defect. A Power analysis will be performed to determine the number of animals needed per experimental group to obtain statistically trustworthy data and that it would be implausible that the effect is based on chance. Therefore, an hypothesis will set with continuous variables, which ensures that no unnecessary high numbers of rabbits will be used. This formula is $n=1+2C(s/d)^2$ in which the C-value is calculated with the power (1-β) and the wanted significance level (α). When two groups (experimental versus control) will be compared (with the power of 0.8 and a significance level of 0.05) it will result in a C-value of 7.85. The s- and d- values represent the estimated standard deviation (s) (e.g. 0.7) and the expected difference between the experimental and control groups (e.g. 1). This would lead to an n = 8.69. The number of n=10 per group (two implants per rabbit, 40 implants in 20 rabbits) would therefore be chosen, since one rabbit might drop out due to infections or swelling of contaminants. Based on literature an n=10 is a well-accepted number to achieve significant differences.

B. The animals

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

Twenty female New Zealand White rabbits (4-5 months) with a weight of approximately 3.5 kg will be used as experimental animals. New Zealand White rabbits are a well-described model to investigate bone regeneration in a trabecular bone defect. Due to the dimensions of the screws, this is also the smallest animal model before a dog model to physically allow implantation of these screws.

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.

The concentration of testosterone/alendronate was tested in in vitro cell culture studies. There, it was shown that these constructs were stimulating osteoblasts, while simultaneously inhibiting osteoclasts. Before we can test screws coated with testosterone/alendronate in clinical situations, it is necessary to prove in an animal model that these screws would be a good alternative for current treatments. Bone turn-over and the behavior of these screws by exposing them into a complex environment can only be studied in animal models. Due to the dimensions of the screws, rabbits are the smallest animal species before a dog to physically allow implantation of these screws. The number of 9 rabbits per time point (20 rabbits in total) is statistically sufficient for this experimental study. During the surgical procedures, anesthesia and analgesia is applied to reduce the discomfort of the rabbits as much as possible.

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

If complications such as inflammation or swelling occurs or should the animals suffer visually, then the animals can be withdrawn from the study. This will always be in consultation with bio-technicians and a veterinarian. If the responsible researchers, the laboratory animal experts and the veterinarian are not reachable, a veterinarian or bio-technician can withdraw the rabbits from the study without consultation.

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.

Rabbits will be housed individually due to the surgical procedures.

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.

Surgery will be performed under appropriate anesthetics. To minimize postoperative pain analgesic medication will be given. All anesthetics and analgesics given (type, dosage, frequency) will be **decided on** in consultation with the IvD.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Possibly complications like infections or swelling could occur due to the surgical procedure, resulting in the suffering (anxiety, fear, loss of appetite) of the rabbits.

Explain why these effects may emerge.

Infections or swelling due to contaminants can't be completely eliminated from the operating theatre. Despite, all preventive microbiological procedures, 5% of all operations performed results in microbiological infections.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

The implanted constructs will be manufactured under GLP conditions. After producing the constructs, a final sterilization step will be performed to guarantee sterility. This will also be performed for all other equipment used in the surgical theatre. Therefore, micro-organisms will be reduced to a minimum in the surgical area.

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.

Preoperative antibiotic treatment will be given to significantly reduce, but not eliminate, the 5% risk of bacterial contamination during the surgical procedure. If afterwards animals would visually suffer, for instance by >20% weight loss or would not use both paws normally, then the animals can be withdrawn from the study. This will always be in consultation with bio-technicians and a veterinarian. If the responsible researchers, the laboratory animal experts and the veterinarian are not reachable, a veterinarian or bio-technician can withdraw the rabbits from the study without consultation.

Indicate the likely incidence.

Not expected.

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').

Moderate discomfort.

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.

Samples and their surrounding tissue will be explanted for torque testing, MicroCT and histological analysis. Therefore, rabbits will be euthanized.

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



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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 5 | Demineralized Bone Matrix (DBM) mixed with testosterone and alendronate loaded microspheres implanted in rabbit femoral defects |
- 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.

Twenty-five female New Zealand White rabbits (4-5 months) with a weight of approximately 3.5 kg will be used as experimental animals. The samples consist of a commercially available bone filler, demineralized bone matrix (DBM), mixed with testosterone and alendronate loaded microspheres. The microspheres will degrade in time to allow a sustained release of testosterone and alendronate. Each rabbit will receive two samples in a trabecular bone defect as created in the left medial and right medial distal femur. In this way, forty implants (and 10 empty defects) will be placed in twenty-five rabbits. The empty defect will only be analyzed after 12 weeks to evaluate if the created defect will not heal spontaneously. After three, six and nine weeks fluorochromes will be injected to be deposited into the matrix to visualize bone formation in time. Blood will be obtained before the start of the surgery and after each two weeks during implantation period of twelve weeks. Specific ELISA's will be used to determine the serum levels of PINP and CTX. MicroCT and histological analysis will be performed ex vivo after six and twelve weeks of implantation to evaluate the bone tissue response. Ten implants per experimental group will be used, two implants per rabbit.

| | DBM + loaded microspheres | DBM + microspheres | Empty defects |
|---------------------------|--|--------------------|----------------------------------|
| New Zealand White Rabbits | MicroCT and histology (6 and 12 weeks) | | MicroCT and histology (12 weeks) |

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

Surgery will be performed under general inhalation anesthesia. Anesthesia will be induced by an intravenous injection of Propofol and atropine, and will be maintained by ketamine/medetomidine. The anesthesia will be antagonised after surgery by Antisedan. To reduce the peri-operative infection risk, the rabbits will receive antibiotic prophylaxis (Baytril 2.5% (enrofloxacin), 5–10 mg/kg). During anesthesia, the rabbits will be immobilized on their back and the surgical areas will be shaved and disinfected with povidone-iodine. A longitudinal incision will be made down to the periosteum. Subsequently, a midline incision will be created in the periosteum. The periosteum will be undermined and lifted off the distal femora. With several burrs (with an increasing burr diameter) the defects in the femora will be drilled from the medial direction to obtain undersized cylindrical defects. After insertion of the screws, the periosteum and soft tissue will be closed using resorbable Vicryl sutures. During the implantation period, fluorochromes will be subcutaneously injected in the neck. Directly after surgery and at least two days post-operative, an NSAID (Metacam) will be given. The first injection of oxytetracycline (25 mg/kg) will be administered 3 weeks post-surgery, the mid label with alizarine complexon (30 mg/kg) will be injected 6 weeks post-surgery and the third and last label of calcein green (15 mg/kg) will be injected 9 weeks post-surgery. The rabbits will be euthanized after six and twelve weeks post-surgery by an overdose of sodium pentobarbital. Experience with trabecular bone defects in New Zealand White rabbits were gained in the past by the principal investigator. (Link et al. Biomaterials. 2008 Feb;29(6):675-82.)

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

In this experimental study twenty-five New Zealand White rabbits in total will be used to evaluate if the proposed DBM mixed with testosterone and alendronate loaded microspheres can be translated into an orthotopic defect. A Power analysis will be performed to determine the number of animals needed per experimental group to obtain statistically trustworthy data. Therefore, an hypothesis will set with continuous variables, which ensures that no unnecessary high numbers of rabbits will be used. This formula is $n=1+2C(s/d)^2$ in which the C-value is calculated with the power (1-β) and the wanted significance level (α). When two groups (experimental versus control) will be compared (with the power of 0.8 and a significance level of 0.05) it will result in a C-value of 7.85. The s- and d- values represent the estimated standard deviation (s) (e.g. 0.7) and the expected difference between the experimental and control groups (e.g. 1). This would lead to an n = 8.69 in this example. The **number** of n=10 per group (two implants per rabbit, 50 implants in 25 rabbits) would therefore be chosen, since one rabbit might drop out due to infections or swelling due to contaminants. Based on literature an n=10 is a well-accepted number to achieve significant differences.

B. The animals

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

Twenty-five female New Zealand White rabbits (4-5 months) with a weight of approximately 3.5 kg will be used as experimental animals. New Zealand White rabbits are a well-described model to investigate bone regeneration in a trabecular bone defect. Due to the dimensions of the implants, this is also the smallest animal model before a dog model to physically allow implantation.

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.

The concentration of testosterone/alendronate was tested in in vitro cell culture studies. There, it was shown that these constructs were stimulating osteoblasts, while simultaneously inhibiting osteoclasts. Before we can test DBM mixed with testosterone and alendronate loaded microspheres in clinical situations, it is necessary to prove in an animal model that these implants would be a good alternative for current treatments. Bone turn-over and the behaviour of these implants by exposing them into a complex environment can only be studied in animal models. Due to the dimensions of the implants, rabbits are the smallest animal species before a dog to physically allow implantation. In this study, rabbits are the lowest animal species in which we can examine the bone turn-over properly. The amount of 9 rabbits per time point (25 rabbits in total) is sufficient for this experimental study. During the surgical procedures, anesthesia and analgesia is applied to reduce the discomfort of the rabbits as much as possible.

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

If complications such as inflammation or swelling occurs or should the animals suffer visually, then the animals can be withdrawn from the study. This will always be in consultation with bio-technicians and a veterinarian. If the responsible researchers, the laboratory animal experts and the veterinarian are not reachable, a veterinarian or bio-technician can withdraw the rabbits from the study without consultation.

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.

Rabbits will be housed individually due to the surgical procedures.

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.

Surgery will be performed under appropriate anesthetics. To minimize postoperative pain analgesic medication will be given. All anesthetics and analgesics given (type, dosage, frequency) will be **decided on** in consultation with the IvD.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Possibly complications like infections or swelling could occur due to the surgical procedure, resulting in the suffering (anxiety, fear, loss of appetite) of the rabbits.

Explain why these effects may emerge.

Infections or swelling due to contaminants can't be completely eliminated from the operating theatre. Despite, all preventive microbiological procedures, 5% of all operations performed results in microbiological infections.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

The implanted constructs will be manufactured under GLP conditions. After producing the constructs, a final sterilization step will be performed to guarantee sterility. This will also be performed for all other equipment used in the surgical theatre. Therefore, micro-organisms will be reduced to a minimum in the surgical area.

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.

Preoperative antibiotic treatment will be given to significantly reduce, but not eliminate, the 5% risk of bacterial contamination during the surgical procedure. If afterwards animals would visually suffer, for instance by >20% weight loss or the rabbit would not use it both paws, then the animals can be withdrawn from the study. This will always be in consultation with bio-technicians and a veterinarian. If the responsible researchers, the laboratory animal experts and the veterinarian are not reachable, a veterinarian or bio-technician can withdraw the rabbits from the study without consultation.

Indicate the likely incidence.

5%.

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').

Moderate discomfort.

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.

Samples and their surrounding tissue will be explanted for histological analysis. Therefore, rabbits will be euthanized.

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

Vragen d.d. 25 juli 2015:

- Tekstueel en redactioneel (verduidelijking, aanvulling en onderlinge afstemming van bepaalde tekstpassages en correcte invulling van het formulier, taalgebruik in de NTS).
- Nadere toelichting van het experimental design m.b.t. de evt. daarin opgenomen beslismomenten en nadere toelichting en onderbouwing van het gebruik van het osteoporose model.
- Nadere toelichting en onderbouwing van dierexperiment #1, #2 en #3.
- Onderbouwing van de keuze voor diersoort, leeftijd en sexe.
- Toelichting m.b.t. de te gebruiken anesthetica en analgetica.
- Nadere toelichting en onderbouwing van de toe te passen huisvesting.
- Nadere toespitsing van de toe te passen HEP-criteria.
- Nadere toelichting en onderbouwing van de (maximale) aantallen dieren en van de primaire meetparameters.

Vragen d.d. 13 september 2015:

- Toelichting m.b.t. de te gebruiken anesthetica en analgetica.
- Redactioneel (verduidelijking en aanvulling van tekstpassage in de NTS).

- Datum antwoord: 1 september 2015 en 18 september 2015
- Strekking van het antwoorden: de vragen zijn naar tevredenheid beantwoord, aanvraag na aanpassing 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 doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Jaarlijks worden wereldwijd miljoenen patiënten behandeld vanwege uiteenlopende botproblemen. Bovendien is er als gevolg van de gemiddeld hogere leeftijd een toenemend aantal patiënten met botgenezingsproblemen als gevolg van osteoporose. Bij de behandeling van (gecompliceerde) botbreuken en -defecten wordt het gebruik van lichaamseigen botmateriaal nog steeds als de gouden standaard beschouwd. Hieraan zijn echter diverse beperkingen en complicaties verbonden. Zo is er is slechts een beperkte hoeveelheid weefsel beschikbaar, het botweefsel sterft af na transplantatie en is moeilijk vorm te geven. Bovendien betekent het verkrijgen van eigen botweefsel een extra (en pijnlijke) chirurgische ingreep voor de patiënt, met het risico van meer complicaties. Er is verder geen therapie beschikbaar waardoor botdefecten en/of -breuken sneller kunnen genezen. Met dit project wordt beoogd een lokaal toe te passen dragermateriaal te ontwikkelen dat beladen is met een combinatie van testosteron en alendronaat en dat het botgenezingsproces en de integratie van implantaten zou moeten bevorderen. Het is de verwachting dat toepassing van deze therapie zal leiden tot tijd- en kostenbesparing in de gezondheidszorg en een verbeterde kwaliteit van leven voor de patiënt.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De *in vivo* experimenten worden uitgevoerd in reeds bestaande diermodellen voor dit type studies. Op basis van *in vitro* data zijn reeds aanwijzingen verkregen dat de te testen agentia inderdaad kunnen leiden tot stimulatie van botvormende cellen c.q. inhibitie van botresorberende cellen.

5. Er is in wettelijk opzicht geen sprake van 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 ondergaan maximaal matig ongerief als gevolg van de experimentele procedures en als gevolg van mogelijke complicaties zoals ontstekingen en zwellingen. Dieren die het humane eindpunt bereiken worden uit proef genomen en geëuthanaseerd.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Voor dit type onderzoek zijn levende dieren nodig, aangezien de complexe processen die betrokken zijn bij botvorming en -heling maar beperkt buiten het lichaam kunnen worden nagebootst. De te testen agentia zijn vooraf in vitro getest op de gewenste eigenschappen. De te gebruiken diermodellen zijn de kleinste diersoorten die geschikt zijn voor dit type onderzoek.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. De dierstudies zijn gefaseerd opgezet, waarbij tussentijdse beslismomenten zijn opgenomen. Er wordt pas begonnen aan een volgend stadium van de studie als in het voorgaande experiment goede resultaten zijn behaald. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De resultaten uit een voorgaand stadium worden ook gebruikt om het aantal benodigde dieren in de volgende studie te berekenen. Door gebruik te maken van *in vivo* Micro CT is het bovendien mogelijk om de botformatie in de loop van de tijd bij dezelfde dieren te volgen. Dit levert naast betrouwbare informatie tevens een enorme besparing op van het aantal benodigde dieren.
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. Daar waar van toepassing worden experimentele procedures uitgevoerd onder toepassing van adequate anesthesie en analgesie, om zoveel mogelijk ongerief te voorkomen. De dieren worden dagelijks gecontroleerd. Dieren die het humane eindpunt bereiken worden geëuthanaseerd.
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10.

D

e 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.

Slecht genezende botbreuken en andere slecht genezende botdefecten vormen een belangrijk probleem in de geneeskunde. Dit project beoogt een lokaal toe te passen dragermateriaal te ontwikkelen dat beladen is met een combinatie van testosteron en alendronaat en dat het botgenezingproces en de integratie van implantaten zou moeten bevorderen. Samen met andere nieuwe ontwikkelingen op het gebied van botvervangende materialen zou dat een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan de oplossing van dit probleem. 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 substantieel belang.

Tegenover dit substantiële belang staat het feit dat de dieren in deze experimenten matig 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 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

X 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
AVD905002015159

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 AVD905002015159. 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: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
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 juli 2015
Geplande einddatum: 1 juli 2018
Titel project: Local delivery of testosterone and alendronate to aid bone (fracture) healing and to improve osseointegration of implants
Titel niet-technische samenvatting: Plaatselijke afgifte van testosteron en alendronaat voor een sneller herstel van botbreuken en - defecten en voor het verbeteren van de verankering van bostschroeven in bot.
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:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Schaijk

Datum:

3 juli 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
AVD905002015159

Bijlagen

2

Datum 24 september 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 september 2015

Vervaldatum: 24 oktober 2015

Factuurnummer: 15700159

| Omschrijving | Bedrag |
|--|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015159 | € 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.

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 13 oktober 2015 tot en met 1 juli 2018, voor het project "Local delivery of testosterone and alendronate to aid bone (fracture) healing and to improve osseointegration of implants" met aanvraagnummer AVD905002015159, volgens advies van Dierexperimentencommissie

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Voorzitter LvD 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 21 september 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 18 september 2015, ontvangen op 21 september 2015.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|--|---------------|-------------------------|--|
| Test surgery and MicroCT scanning of Wistar rats and bone marrow collection | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar; vrouwelijk; 12-weeken oud | 10 | Terminal / non-recovery | Er worden alleen vrouwelijke ratten gebruikt, omdat het onderzoek gericht is op osteoporose, die komt vaker bij vrouwen dan bij mannen voor. |
| Sub-periosteal cranial proof-of-principle study in Wistar rats | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar; vrouwelijk; 12-weeken oud | 18 | Matig / moderate | Er worden alleen vrouwelijke ratten gebruikt. |
| Critical-sized cranial defect in Wistar rats | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar; vrouwelijk; 12-weeken oud | 80 | Matig / moderate | Er worden alleen vrouwelijke ratten gebruikt. |
| Femoral condyle screw implantation in New Zealand White rabbits | Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / New Zealand White; vrouwelijk; 4-5 maanden oud | 20 | Matig / moderate | Er worden alleen vrouwelijke konijnen gebruikt. |
| Demineralized Bone Matrix (DBM) mixed with testosterone and alendronate loaded microspheres implanted in rabbit femoral defects | Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / New Zealand White; vrouwelijk; 4-5 maanden oud | 25 | Matig / moderate | Er worden alleen vrouwelijke konijnen gebruikt. |

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.

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.

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 13 oktober 2015 14:01
Aan: [redacted]
CC: [redacted]
Onderwerp: Beschikking AVD905002015159
Bijlagen: Beschikking 159.pdf

Geachte [redacted]

Deze beschikking is ook per post verstuurd.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 14 oktober 2015 12:22
Aan: [Redacted]
Onderwerp: terugkoppeling besluit op aanvraag AVD905002015159

Geachte DEC leden,

Enige tijd geleden hebben wij een advies van u ontvangen betreffende aanvraag AVD905002015159, 'Local delivery of testosterone and alendronate to aid bone (fracture) healing and to improve osseointegration of implants'.

Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug. De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen.

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

De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

We hopen u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

| Inventaris Wob-verzoek W17-05 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|--|
| | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | | |
| nr. | document NTS 2015160 | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | | |
| 2 | Projectvoorstel | | | | x | x | | x | | |
| 3 | Bijlage beschrijving dierproeven | | | | x | x | | x | | |
| 4 | NTS | x | | | | | | | | |
| 5 | Apendix | | | | x | x | | x | | |
| 6 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | | |
| 7 | Advies DEC | | | | x | | x | x | | |
| 8 | Advies CCD aan bestuur | | x | | | | | | x | |
| 9 | Beschikking en vergunning | | | | x | x | x | x | | |



20 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 / 1160
 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?
- | |
|--|
| <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 - 10 - 2015 |
| Einddatum | 1 - 10 - 2017 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|---|
| Development of a guinea pig model to study immunogenicity of RSV F vaccines in pups in the presence of RSV F-specific pre-existing immunity by maternal transfer of antibodies. |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|---|
| Ontwikkelen van een cavia diermodel voor het uittesten van vaccinatie mogelijkheden voor jonge kinderen tegen respiratoir syncytieel virus (RSV). |
|---|
- 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 | 3 - 7 - 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: 16 oktober 2015

Betref: Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD905002015160

Geachte heer / mevrouw,

Bijgaand de getekende aanvraag Projectvergunning Dierproeven AVD905002015160 met als titel:

Development of a guinea pig model to study immunogenicity of RSV F vaccines in pups in the presence of RSV F-specific pre-existing immunity by maternal transfer of antibodies.

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

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]



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, the applicant of this project proposal offers (already developed) preclinical models in which these strategies can be tested in relevant in vivo settings. These preclinical models are available at the requestor or can be developed by the requestor to test the strategies for third parties (in general pharmaceutical companies). These third parties make use of the expertise of the requestor for the choice of a particular model to test the strategy.

Respiratory syncytial virus (RSV) is responsible for over 30 million new acute lower respiratory infection episodes in children under five, resulting in more than 3.4 million hospital admissions associated with severe RSV disease each year. Over 90% of all RSV-associated deaths are estimated to occur in low and middle-income countries (LMIC). Prophylactic and therapeutic intervention using an RSV-specific antibody is effective and reduces severe disease; however this intervention is very costly. With this in mind, two strategic goals for RSV vaccine development (noting that global disease burden is focused on low and middle income countries, LMIC) have been proposed by the WHO:

- maternal/passive immunization in order to prevent RSV disease in those under 6 months; and
- active paediatric immunization in order to prevent RSV disease in infants and young children beyond the time window served by maternal immunization.

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. However, since maternal antibodies tend to wane over time, it is also important to investigate whether vaccination of the very young is possible in the presence of maternally derived antibodies. Additionally, 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 target the RSV F protein has shown to reduce RSV disease burden in high-risk infants. Therefore it is reasoned that vaccination with the F protein of RSV could mimic the protection observed after passive transfer of a commercially available F-specific monoclonal antibody preparation. 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 ([REDACTED]).

Different animal models are available for studying intervention strategies against respiratory syncytial virus (RSV), that each 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, both placentation and trans-placental transfer of maternal antibodies in guinea pigs is comparable to humans (prenatal transfer of antibodies to the foetus). Additionally, the species of choice has to be susceptible to infection with RSV. Therefore the

guinea pig is the most optimal model for this project's objectives:

- Transfer of RSV-specific maternally derived antibodies to new-born pups
 - The effect of RSV-specific pre-existing immunity in new-born pups on vaccination early after birth
- In contrast, other small animal models are either less susceptible to infection (mice), susceptibility is not known (rats) or antibodies are not transferred transplacentally (cotton rats, mice and ferrets).

The placentation of the guinea pig is comparable to humans: antibodies can be transferred from the mother to the "child" via trans-placental transport. Maternal immunity is the main early defence against infectious agents in new-borns. 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), that are specific for the Fc portion of IgG. Guinea pig gestational periods are lengthy compared to other rodents, ranging from 65-70 days (████████████████████), 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 (████████████████████). 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 (████████████████████). These features render the guinea pig a useful model to study trans-placental transfer of (RSV specific) antibodies and the effect of these maternally derived antibodies on immunization strategies against RSV early after birth, thus in the presence of pre-existing immunity.

This project proposal will be used to set up a guinea pig model to investigate the immunogenicity of newly developed RSV vaccines in the presence of pre-existing immunity by transfer of RSV-specific maternal antibodies. Separate animal experiments (not part of this project proposal) will aim at the most optimal vaccination regime in order to generate (high) levels of serum (neutralizing) antibody responses in adult animals. In the studies to be performed within this project, the effect of these maternally derived antibodies on vaccination of pups with newly developed replicating RSV vaccines (i.e. vector vaccines) will be investigated by assessing both immunogenicity (the ability to generate RSV specific immune responses) and efficacy (the ability to protect from challenge infection with RSV) of these vaccines. Results can be used to assess whether pre-existing immunity in young children by maternal transfer of RSV-specific antibodies can hamper vaccination efficacy in very young infants (one of the most susceptible target populations to contract severe disease after RSV infection after maternal antibodies have waned). The latter one of the goals set by the WHO in the prevention of RSV-induced disease (see above).

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 main objective of this project proposal is to develop a guinea pig model to study immunogenicity of RSV F vaccines in the presence of RSV F-specific pre-existing immunity by maternal transfer of antibodies. It has been shown by others that prenatal transfer of antibodies do occur in guinea pigs as

they do in humans, therefore the guinea pigs provides a good model to study this. Additionally, the results from this study will be used to conduct an efficacy study to investigate the protective efficacy after vaccination in the presence of pre-existing immunity. Since it has been shown that guinea pigs are susceptible to infection, the model can also be used for future efficacy studies. Additionally, the requestor of this project has a lot of experience in the development of different preclinical models and a number of these models have been published in peer-reviewed journals (e.g. [REDACTED]). This expertise ensures that the objectives will be achieved: development of a guinea pig model to study immunogenicity of RSV F vaccines in pups in the presence of RSV F-specific pre-existing immunity by maternal transfer of antibodies.

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 new-borns, 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. 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 population 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. Numerous RSV vaccines in development are seeking a specific recommendation for use during pregnancy ([REDACTED]). As such, regulatory agencies in e.g. the United States are working with industry to delineate the processes to develop and approve vaccines for use during pregnancy ([REDACTED]). Treatment, either prophylactic or therapeutic, using an RSV-specific antibody preparation has shown to be effective to reduce disease burden after RSV infection. Prophylactic treatment of the very young before start and during the yearly RSV season has shown that disease burden can be controlled leading to reduction of hospital admissions. Unfortunately, this treatment is very expensive and therefore not feasible to be used in developing countries. It has been estimated that 99% of the deaths caused by RSV infection in the first year of life occur in the developing countries, which cannot benefit from costly intervention strategies as explained above. Therefore, a lot of effort has been taken by both the WHO and [REDACTED] to translate affordable possibilities in protection against RSV. [REDACTED] is an organization that translates ideas into health solutions, with a focus on child survival, maternal and reproductive health, and infectious diseases focused on the developing countries. However, breakthroughs in this research can also be translated to the developed countries ([REDACTED]).

Although mortality due to RSV infections in the very young are rarely seen, quality of life could be raised if the very young are protected due to transfer of maternal antibodies in the first period of life. Additionally, since maternally antibodies tend to wane over time, early vaccination of the target population (the very young) is also important. As been shown ([REDACTED]) that RSV-specific antibodies are readily detectable at six months of age, but are mainly absent at twelve months of age. To protect the target population, vaccination has to start early after birth to be able to protect at the time that the maternally derived antibody levels are diminished. This poses another problem, being that vaccination has to be performed in the presence of specific antibodies, which could negatively interfere in the effectiveness of the vaccination. These antibodies could bind both the vector to be used, but also the transgene and thus preventing the induction of an immune response. A potentially promising vaccination strategy against RSV is either attenuated RSV viruses or recombinant (either or not replication deficient) viruses expressing one or more RSV proteins. 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. Recombinant viruses, either or not replication deficient, could be a better candidate, since expression of

the transgene (i.e. the main target for induction of immune responses, in the project proposal these will be RSV genes) can be driven by the choice of the vector. These vector vaccines are promising candidates to test in the guinea pig model described in this project proposal. Since the 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 even in the presence of pre-existing immunity.

3.4 Research strategy

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

For a schematic overview of the study set-up see Appendix 1: Study design

The most optimal vaccination regime (antigen in absence or presence of adjuvant) will be investigated in a separate experiment (AVD905002015154). Based on the results of those studies two regimes will be selected for priming (before mating) and boosting (after mating and before partum) of female guinea pigs (mothers to be). As positive and negative control the following control groups are included in the study design: infection with RSV (induction of antibodies after natural infection) and priming with PBS (no presence of RSV-specific immunity in mothers and subsequently the pups). The choice of positive control group (infection with RSV) is based on published data by Buraphacheep et al, who showed that antibodies induced by natural infection could be transferred prenatally to the pups and resulted in detectable RSV-specific neutralizing levels post partum. Additionally, the levels as measured in the pups were comparable to levels measured in the mothers indicating efficient prenatal transfer of antibodies. Earlier studies have shown that the main neutralizing component in the humoral immune response to RSV is directed to the RSV-F protein and this is also confirmed by the prophylactic and therapeutic efficacy of a commercially available neutralizing antibody preparation (Synagis), which is RSV-F protein specific and protects against infection/RSV disease in the very young. Whether also RSV-F protein specific antibodies as induced by vaccination with protein are able to transfer the placenta has been shown by [REDACTED] in which mothers to be were vaccinated using F-protein in the absence or presence of an adjuvant. Results showed that the induced neutralizing RSV F-specific antibodies were actively transferred prenatally and were readily detectable in the pups. Since the specific nature of the vaccine is different between the published study (nanoparticle) and the here proposed study (protein), the data cannot be compared directly with regards to induction of neutralizing antibody responses and the subsequent prenatal transfer to the pups. Therefore, a gate keeper is included in the study in which guinea pigs will receive an RSV infection before mating, which will induce neutralizing antibody responses, that are subsequently transferred to the pups as shown by Buraphacheep et al. After birth, the pups of each group are randomly divided over three groups receiving empty vector (vector control group), a specific vaccine (vaccine group) or PBS (negative control group). On regular time-points during the study (both in the mothers and in the pups) blood samples are collected to determine the functional antibody levels against RSV, through which the immunogenicity of the vaccines can be determined.

For challenge infection with RSV, used to assess the efficacy of the vaccines, a GO / NO GO selection point has been included: based on the results of the levels of functional antibodies it may be decided whether or not to challenge the pups with RSV. If the antibody levels of the pups remain stable or rise over time after booster vaccination of the pups, it can be concluded that an immune response has been induced even in the presence of maternally derived antibodies. This warrants efficacy assessment of the vaccine through challenge infection of the pups.

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.

To study the trans-placental transfer of maternally derived antibodies (MDA) and the influence of MDA on the immunogenicity and efficacy of neonatal vaccination with viral vectors expressing the RSV F protein, the following components make up the study design:

- Vaccination of females (mothers to be) to induce RSV F specific antibody responses (vaccine groups, RSV infected group (positive control), PBS group (negative control)
 - Upon synchronization, each group of [REDACTED] will be primed and a blood samples will be drawn at regular time-points.
- Fertilization of females of all groups and the delivery of pups to which the vaccine induced RSV F

specific antibody responses (MDA) are transferred transplacentally during gestation.

- Each group of females is allowed to interact with the male used for co-habitation, with the aim to induce pregnancies in all females.
- After mating, the females will receive a booster vaccination. Two weeks later, females from all groups will be sampled for blood to allow serological analysis of antibody responses.
- Delivery of pups is allowed to occur naturally (the gestation period is approximately 63 days).
- Immunogenicity of viral vector vaccines in the presence of MDA through prime-boost vaccination of pups
 - Post partum, blood will be drawn at regular time-points from mothers and pups of all groups. After delivery, pups from each group of mothers will be assigned to three study subgroups.
 - In order to allow synchronization of post-natal vaccination, the pups will be vaccinated (prime) within a period of 7 days after birth. Vaccination will coincide with s.c. implantation of a microchip for identification purposes. The pups of each subgroup will be i.m. vaccinated with either a vector control, the vector vaccine or PBS (negative control).
 - Four weeks after priming, the pups of all subgroups will receive a booster vaccination, which will be the same as the prime vaccination.
- Serological analysis of RSV neutralizing antibody titers in pups to be used as selection points: GO / NO GO for assessment of vaccine efficacy to protect pups against challenge infection with RSV. This GO / NO GO will be dependent on the vaccine to be used in the pups and the expected levels of RSV-specific neutralizing antibodies raised. This will be decided for each separate experiment in close consultation with the Sponsor as well as the IvD.
 - After the booster vaccination, the pups blood will be sampled every two weeks for serological analysis of RSV virus neutralizing antibody responses to allow the assessment of the immunogenicity of the vaccine regimen. The outcome of these analyses determines whether or not the animals will be challenged with RSV (GO / NO GO) one week later.
 - If challenge with RSV is a NO GO, a final sample will be taken at 9 weeks after booster vaccination and the animals will be euthanized (end point of immunogenicity study).

Animals that are to be challenged will receive RSV via i.n. administration. Challenged animals will be followed up until day 7 after infection, on which they will be euthanized and blood and relevant tissues will be taken to perform virological, histopathological and immunochemistry analyses to allow assessment of efficacy of protection against RSV infection.

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 current project proposal consists of only 1, internally coherent, study.

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 | Development of a guinea pig model to study immunogenicity of RSV F vaccines in pups in the presence of RSV F-specific pre-existing immunity by maternal transfer of antibodies. |
| 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 | Development of a guinea pig model to study immunogenicity of RSV F vaccines in pups in the presence of RSV F-specific pre-existing immunity by maternal transfer of antibodies. |

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.

This study aims at testing an RSV vaccine for prevention of RSV infections in young children. Since the presence of specific maternally derived antibodies could interfere in the efficacy of the vaccination in these young children, the current project has been designed. Of all animal models for RSV, guinea pigs prove to be representative to humans: animals are susceptible to infection and placentation is comparable between humans and guinea pigs. Thus, maternal antibodies can be transported from the mother to the pup and their effect can be studied on vaccination efficacy.

The primary outcome parameters of the study are the induction of neutralizing antibody responses in pups in the presence of pre-existing immunity.

It has been shown by others that maternally derived antibodies in guinea pigs tend to have a short half-life of about 7-8 days. Thus, stable or rising neutralization responses are a good primary outcome for the induction of immune responses in the presence of pre-existing immunity.

Guinea pigs have been used by others for infection and efficacy experiments and it has been shown that guinea pigs are susceptible for infection with RSV. Animals show replication of the virus in the lower respiratory tract and RSV-induced pathology with mild and transient symptoms. These parameters indicate that this model is suitable to show efficacy of the vaccination strategy in the pups.

If it is decided that the animals will be challenged (see GO description below) based on the serological

results in the pups after prime-boost, it may be decided to challenge the animals with RSV. In the case of a challenge, the reduction in viral load will become a secondary outcome parameter next to the primary outcome parameter induction of neutralizing antibody responses in the pups.

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

Before start of the study, the immunogenicity of the to be used vaccines (with respect to dose and need for adjuvation) is tested in their capacity to induce high levels of neutralizing antibodies. The results from this immunogenicity study will be used to determine the vaccination regime of the mothers.

A schematic representation of the design of the studies is provided in Appendix A. Time points given in the schedule are an indication, specific time points may vary slightly from study to study, depending on the vaccine preparations to be tested.

All administration (microchip administration, vaccination, and infection), sampling (blood) and euthanasia procedures will be performed under isoflurane anaesthesia.

Blood sampling will be performed via the vena cava cranialis or vena saphena, depending on accessibility and volumes will not exceed 8 ml/kg/28 days. For serological analysis approximately 0.2-0.4ml of whole blood (i.e. approximately 0.1-0.2ml of serum) is needed per time point. Considering the body weight of a adult female (~700g) and a pup (~100g at birth) and a maximum number of 3 blood collection point per four weeks, the total volume will not exceed the maximum allowed total volume of blood taken from mothers (5.6ml) and pups (0.8ml).

The animals will be checked daily and weighed weekly to monitor their general health status.

- Animals ≥ 6 weeks of age will enter the facilities. The animals will be randomly assigned to four groups, which will consist of ■■■■■ and ■■■■■ each. Females will be housed in groups of ■■■ and cohabitated with ■■■■ male. The conditions will be that the animals can see and smell each other but without the possibility of physical interaction. This will be made feasible by separating the females and the male by means of e.g. chicken wire. This co-habitation will be part of the acclimatization period and allow synchronization of the oestrous cycle of the females. During this acclimatization period the behaviour of the animals is closely monitored and if signs of stress are observed in one or more of the males, males can be transferred to another group of ■■■■ females. The change of the latter will be small, as is described in section B.

NB: unlike for instance rats in which co-habitation can lead to stress, it has been shown that co-habitation of guinea pigs in which the animals can see and smell each other but not physically interact, does not lead to stress and is recommended. According to the "Guidelines for the housing of Guinea pigs in Scientific Institutions" in the "Animal Research Review Panel" it is described that animals should not be housed individually, but in case of separation the animals should be in visual, auditory and olfactory contact with other animals.

- After synchronization, each group of ■■■ females will be provided subcutaneously between the scapulae with microchips for identification purposes and either be primed intramuscularly (i.m.) with RSV-F protein vaccines (treatment groups 1 and 2) or intranasally (i.n.) infected with RSV (positive control group 3) or i.m. provided with PBS (negative control group 4). The maximum volume to be applied i.m. will not exceed 0.1 ml per injection site with a maximum of two injection sites/vaccination time point. RSV inoculation volume to be applied i.n. will not exceed 0.2 ml (0.1 ml per nostril). This RSV infection will cause mild transient respiratory symptoms. Also, a blood sample will be drawn.
- Depending on the outcome of an immunogenicity study to be performed before this study (not part of this project proposal, this information will be part of the working protocol that will be provided to the IvD), an additional vaccination before mating may be required. At this time point, a blood sample will be taken as well. Next, each group of females is allowed to interact with the male used for co-habitation, with the aim to induce

pregnancies in all females. After mating has completed, the males cohabitated with females primed with protein or PBS, groups 1, 2 and 4 will be separated from the females for eventual re-use. Males cohabitated with females infected with RSV (group 3) will be euthanized by exsanguination.

- Approximately 4 weeks after priming, the females of groups 1, 2 and 4 will be (booster) vaccinated with RSV-F protein vaccines (groups 1 and 2) or PBS (group 4). Two weeks later, females from all groups will be sampled for blood to allow serological analysis of antibody responses.
- Delivery of pups is allowed to occur naturally (the gestation period is approximately 63 days).
- Post partum, blood will be drawn from mothers and pups of all groups. Also, the pups will be provided with a microchip for identification purposes through s.c. implantation. The pups from each group of mothers will be randomly assigned to three study subgroups (1.1 – 1.3; 2.1 – 2.3; 3.1 - 3.3; 4.1 – 4.3; see Appendix A) without the pups being weaned from their mother. Group sizes will depend on the litter sizes obtained for a specific study group consisting of 4 females. Numbers given in Appendix A are an estimation based on an average litter size of three and a success rate of mating of 75% (3 out of 4). After delivery, each mother and her litter will be housed separately.
- In order to allow synchronization of post-natal vaccination (and for model development purposes in case of efficacy studies), all pups will be vaccinated (prime) 7 days after the birth of the first pups (i.e. all pups will be vaccinated on the same calendar day). This method will not interfere with the outcome of the study, since it has been shown by others (e.g. Pavia et al 1996) that the half-life of IgG antibodies in guinea pig pups is approximately 7 days.
- The pups of all subgroups will be i.m. vaccinated; each subgroup 1 will receive a vector control preparation, subgroup 2 will receive the vaccine and subgroup 3 will receive PBS. The maximum volume to be applied i.m. will not exceed 0.05 ml per injection site with a maximum of two injection sites/inoculation. This synchronization of the pups is expected not to have an influence of the outcome of the study. It has been described in other models that the half-life of maternally derived antibodies in guinea pigs is more than 7 days indicating that the effect of pre-existing immunity by transfer of maternally derived antibodies can be studied when synchronizing vaccination of the pups.
- One week after vaccination of the pups, blood will be sampled for serological analysis.
- Three weeks after birth, pups will be weaned and housed in groups of 4 at most for each gender, depending on the number of females and males born in each litter (i.e. females and males from the same litter will be housed together). If in one litter only one animal is born of a certain gender, the following will be applied. In case of a female, groups will be formed with other females from other litters. In case of a male, the animal will be housed individually, but will be provided additional cage enrichment material and the animal will be in visual, auditory and olfactory contact with other guinea pigs.
- 2 to 5 weeks after priming, the pups of all subgroups will receive a booster vaccination, which will be the same as the prime vaccination.
- After the booster vaccination, blood from the pups will be sampled every two weeks for up to six weeks after the booster vaccination for serological analysis of RSV virus neutralizing antibody responses to allow the assessment of the immunogenicity of the vaccine regimen.
- The outcome of these analyses determines whether or not the animals will be challenged with RSV (GO / NO GO) one week later. For RSV the correlates of protection are not known implicating that a certain neutralization value cannot be given above which animals may be challenged. However, since maternally derived antibodies tend to wane over time, stable or rising antibody levels of the pups indicate that an immune response has been induced even in the presence of maternally derived antibodies. This warrants efficacy assessment of the vaccine through challenge infection of the pups. Therefore, challenge infection with RSV can occur at either 3, 5 or 7 weeks after booster vaccination depending on the results of the serological assays.
- If challenge with RSV is still a NO GO based on the serological analysis of the samples

obtained at 7 weeks after booster vaccination, a final blood sample will be taken at 9 weeks after booster vaccination and the animals (mothers and pups) will be euthanized by exsanguination followed by a lethal dose of sodium pentobarbital.

Groups of animals that are to be challenged with at one of the selected time points will receive a maximum volume of 200 µl of RSV via the i.n. route (max. 100 µl/nostril) at the specified time. Challenged animals will be followed up for a period of 7 days, on which they will be euthanized and blood and relevant tissues will be taken to perform virological, histopathological and (immune-) histochemical analyses to allow assessment of efficacy of protection against RSV infection.

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 is studied of pre-existing immunity by maternally derived antibodies on prime-boost immunization in guinea pig pups, no exact power calculation for the size of the prime-boost pup groups can be performed. Main read-out in these experiments is the immunogenicity of the prime-boost regime in the pups and based on a number of assumptions the following group size can be calculated based on $\alpha=0.05$, power=0.8 and SD of 4 and a difference between groups of 5-6 (log₂ transformed VNA titers), the required group size of the pup groups is estimated to be approximately \blacksquare to \blacksquare ($N=2*(2.8*SD/(mean1-mean2)^2)$). To form homogeneous groups, the pups from different mothers will be randomized over the three different treatment groups after birth (without being weaned). If the results of the first study prove otherwise, the power calculation will be adjusted for future studies or randomization will be based on the generated titers being transferred from the mothers. The latter being part of the model development described in this project proposal.

Additionally, pups are challenged to show whether they are protected against challenge after prime-boost in the presence of pre-existing immunity. It has been shown by Overbaugh and Richardson (JV 2005) that the minimal number of animals needed to show vaccine efficacy after challenge is \blacksquare , therefore group-sizes as mentioned above will always result in significant differences between the groups if there is effect of the treatment.

B. The animals

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

Species: Outbred SPF female and male guinea pigs (Dunkin Hartley strain). For justification of this animal model see refinement in D. In close consultation with the breeder, the males will be selected to be both proven breeders and socialized to the female animals. This will ensure that stress during co-habitation is highly unlikely and the highest change of successful mating after synchronization.

Origin: registered breeder.

Life stage: ≥ 6 weeks of age at the start of the study. Males have to be proven breeders.

Vaccination will be performed in females because trans-placental transfer of maternal antibodies to pups will be assessed. The life stage is chosen since the guinea pigs should be capable to reproduce between the first and the second vaccination.

Estimated numbers: total number of animals in a 2-year period: \blacksquare males, \blacksquare females and \blacksquare pups.

A typical setup would be the determination of immunogenicity in the presence of pre-existing immunity using two different prime-boost regimens in mothers compared to RSV-infected mothers and naïve mothers (PBS primed). When vaccinating the resulting pups with three different regimes (empty vector, vaccine and PBS), per prime-boost regimen of the mothers approximately \blacksquare pups are needed. It is estimated that 75% of all females successfully mate resulting in litters of approximately 3-4 animals. Thus to generate a maximum of \blacksquare animals per experimental pup group for vaccination with the three options (vector, vaccine or PBS) i.e. \blacksquare animals, \blacksquare females should be used with \blacksquare males \blacksquare male for \blacksquare females). In a typical setup 4 different prime (and boost) regimes will be used leading to the following numbers of males and females to be able to test prime-boost in a calculated number of \blacksquare pups:

- Males: \blacksquare
- Females: \blacksquare
- Pups: \blacksquare (based on an average litter size of 3.5 and a 75% mating success).

It is anticipated to perform two of these studies in a 2-year period leading to a total number of males, females and pups of \blacksquare , \blacksquare and \blacksquare , respectively.

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.

All males used in cohabitation with females receiving either protein or PBS, can be re-used. Males used in cohabitation with females infected with RSV cannot be re-used.

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 study trans-placental transfer of maternal antibodies and the effect of maternally derived antibodies on vaccination of pups. There is no in vitro system available that models trans-placental transfer of maternal antibodies and immunogenicity of vaccine preparations.

Refinement: the guinea pig was chosen as an animal model because this study will be used to determine the influence of maternally derived antibodies on the immunogenicity and efficacy of candidate RSV vaccines. 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. In contrast, it has been shown by others that other small models might be available. However, these models have serious drawbacks due to less susceptibility to infection (mice), unknown susceptibility (rats) or antibodies are not transferred transplacentally (cotton rats, mice and ferrets).

Reduction: statistical analysis provided in section A ensures maximum likelihood of significant results using a minimum number of animals. GO / NO GO: based on RSV neutralizing titers observed in pups after prime-boost vaccination, it can be decided to challenge the pups to assess vaccination efficacy of the prime-boost regimen in the presence of pre-existing immunity by maternally derived antibodies to protect from RSV infection. It has been shown by others that maternally derived antibodies in guinea pigs tend to have a short half-life of about 7-8 days. Thus, stable or rising neutralization responses are a good primary outcome for the induction of immune responses in the presence of pre-existing immunity. This ensures that a study setup does not have to be repeated for efficacy assessment. This GO / NO GO decision will be communicated with the IvD. Because of the explorative nature of the study, it is anticipated that one or two studies will be performed to gather enough data for power calculations in future experiments. With this information a new project proposal can be designed based on power calculations with the data obtained in the studies described in this project proposal.

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 as described above. If in a single litter only one male is born, this animal will be housed individually with additional cage enrichment and the animal will be allowed to interact with other animals via visual, auditory and olfactory contact. 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 a replicating vector (pups) and/or RSV preparations (mothers), 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 of the Directive 2010/63/EU?

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

- Complications due to repeated blood sampling e.g. hematomas/stress
- In the animals that will be challenged with RSV, moderate transient respiratory symptoms may be observed.

Explain why these effects may emerge.

- Moderate, transient respiratory symptoms may occur because of the RSV infection characterized by a slightly elevated respiratory rate and nasal exudate.

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 performed on a daily basis. 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 3 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 same holds true for the pups if there is a GO to challenge the pups).

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. If the body condition scoring deviates from normal, this will be registered for the respective animal and this animal is monitored more frequently. Animals displaying an underconditioned body condition in combination with one of the humane endpoint mentioned below will be euthanised. If an animal displays an emaciated body condition, the respective animal will be euthanised directly. The latter two body conditions are highly unlikely due to the nature of the vaccines, which are also safe for human use, and the respiratory symptoms caused by RSV in guinea pigs, which are mild and transient in nature.

- Reduction of body weight greater than 20% compared to normal body weight adjusted for age (see table below) 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 are uncommon and not considered more than moderate 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 mothers and the pups will be euthanized. RSV infected animals will be killed to collect respiratory related tissues to determine the viral load and to allow histopathological and immunohistochemistry analysis. A number of the used males can be re-used (see 2C).

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

Appendix A: Study design

| Immunisation & Sampling Schedule | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|---------|----------|-----------|------|------------------|--|-------------|-----------|---|----------------------|------|----------------|------------------|---------|----|----------------|-------------------|------------|------------|----|---------------|------------------|------|------|----------------|----------------|----------------|
| Group | Animals | No/Group | Pups | Week | Study | 0 | 1 | 5 | 7 | 9 | 10 | 13 | 14 | 16 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 27 | 28 | 29 | 31 | 33 | | |
| | | | | | Pregnancy | | | | | | 0 | 3 | 4 | 6 | 10 | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | Age pups | | | | | | | | | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 8 | 9 | 11 | 13 | | |
| 1 | Females | | | | Start housing ID | | Co-hab tate | B Prime a | B | Boost a ^o | Mate | B ^o | Detect Pregnancy | Boost a | B | B post partum | | Wean males | B | | | | | | B ^E | | |
| | Males | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Pups | | 1.1 | | | | | | | | | | | | | B | Vector control ID | B | Wean males | | B | Vector control B | B*** | | B*** | B*** | B ^E |
| | | | 1.2 | | | | | | | | | | | | | B | Vaccine ID | B | Wean males | | B | Vaccine B | B*** | | B*** | B*** | B ^E |
| | | 1.3 | remainder | | | | | | | | | | | | B | PBS control ID | B | Wean males | | B | PBS control B | B*** | | B*** | B*** | B ^E | |
| 2 | Females | | | | Start housing ID | | Co-hab tate | B Prime b | B | Boost b ^o | Mate | B ^o | Detect Pregnancy | Boost b | B | B post partum | | Wean males | B | | | | | | | B ^E | |
| | Males | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Pups | | 2.1 | | | | | | | | | | | | | B | Vector control ID | B | Wean males | | B | Vector control B | B*** | | B*** | B*** | B ^E |
| | | | 2.2 | | | | | | | | | | | | | B | Vaccine ID | B | Wean males | | B | Vaccine B | B*** | | B*** | B*** | B ^E |
| | | 2.3 | remainder | | | | | | | | | | | | B | PBS control ID | B | Wean males | | B | PBS control B | B*** | | B*** | B*** | B ^E | |
| 3 | Females | | | | Start housing ID | | Co-hab tate | B RSV-A2 | B | | Mate | B ^o | Detect Pregnancy | | B | B post partum | | Wean males | B | | | | | | | B ^E | |
| | Males | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Pups | | 3.1 | | | | | | | | | | | | | B | Vector control ID | B | Wean males | | B | Vector control B | B*** | | B*** | B*** | B ^E |
| | | | 3.2 | | | | | | | | | | | | | B | Vaccine ID | B | Wean males | | B | Vaccine B | B*** | | B*** | B*** | B ^E |
| | | 3.3 | remainder | | | | | | | | | | | | B | PBS control ID | B | Wean males | | B | PBS control B | B*** | | B*** | B*** | B ^E | |
| 4 | Females | | | | Start housing ID | | Co-hab tate | B PBS | B | | Mate | B ^o | Detect Pregnancy | PBS | B | B post partum | | Wean males | B | | | | | | | B ^E | |
| | Males | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Pups | | 4.1 | | | | | | | | | | | | | B | Vector control ID | B | Wean males | | B | Vector control B | B*** | | B*** | B*** | B ^E |
| | | | 4.2 | | | | | | | | | | | | | B | Vaccine ID | B | Wean males | | B | Vaccine B | B*** | | B*** | B*** | B ^E |
| | | 4.3 | remainder | | | | | | | | | | | | B | PBS control ID | B | Wean males | | B | PBS control B | B*** | | B*** | B*** | B ^E | |
| HOUSING | | | | | NORMAL | Groups 1, 2, 4: NORMAL Group 3: DM-II | | | | | | | | | | DM-II | | | | | | | | | | | |

* At least 9 successful pregnancies
 ** Expected
 *** Go/No-Go for challenge infection with RSV-A2 based on VNA responses in serum at 7, 9 or 11 weeks of age
^o Opt onal
^E Endpoint, euthanasia

Abbreviations:
 IM = intramuscular ID = m crochip administrat on for dentif cat on purposes
 IN= intranasal W = body weight
 B = whole blood for serum LW = lung weight
 T = lung tissue after sacrif cat on

Analyses:
 i. All sera from whole blood will be analysed for VNA against RSV-A2
 ii. Weight of the whole lung will be measured;
 iii. Sections of the right lung are subjected to Taqman PCR and virus t tration;
 iv. The left lung is inflated with 10% formalin for hisopathological assessment;

RSV challenge & sampling schedule

| | | | | | |
|----------------|----------------------------------|------|------------------------------------|-----|--|
| 8, 10 or 12*** | | d 0 | | d 7 | |
| W, B | Intranasal challenge with RSV-A2 | W, B | W, T, B, LW, necropsy ^E | | |
| W, B | | W, B | | | |
| W, B | | W, B | | | |
| W, B | Intranasal challenge with RSV-A2 | W, B | W, T, B, LW, necropsy ^E | | |
| W, B | | W, B | | | |
| W, B | | W, B | | | |
| W, B | Intranasal challenge with RSV-A2 | W, B | W, T, B, LW, necropsy ^E | | |
| W, B | | W, B | | | |
| W, B | | W, B | | | |
| W, B | Intranasal challenge with RSV-A2 | W, B | W, T, B, LW, necropsy ^E | | |
| W, B | | W, B | | | |
| W, B | | W, B | | | |
| DM-II | | | | | |



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5347 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
AVD905002015160

Bijlagen

2

Datum 19 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002015160. 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: 5347 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 oktober 2015
Geplande einddatum: 1 oktober 2017
Titel project: Development of a guinea pig model to study immunogenicity of RSV F vaccines in pups in the presence of RSV F-specific pre-existing immunity by maternal transfer of antibodies.
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkelen van een cavia diermodel voor het uittesten van vaccinatie mogelijkheden voor jonge kinderen tegen respiratoir syncytieel virus (RSV).
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:

3 juli 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5347 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
AVD905002015160

Bijlagen

2

Datum 19 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 19 oktober 2015

Vervaldatum: 18 november 2015

Factuurnummer: 15700160

| Omschrijving | Bedrag |
|--|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015160 | € 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.

De vragen d.d. 25-07-2015 hadden betrekking op:

- Titel van het project in overeenstemming brengen met het beschreven project.
- Onderbouwing van het diermodel, in het bijzonder de meerwaarde van het te ontwikkelen model in de cavia ten opzichte van reeds bestaande modellen in de muis en de rat.
- Haalbaarheid van het onderzoek en een indicatie of het te ontwikkelen model ook kan dienen voor het bestuderen van vaccinveiligheid.
- Onderbouwing van het experimental design voor wat betreft het opnemen van zowel een positieve controlegroep (infectie met RSV) als een groep die wordt gevaccineerd t.b.v. het opwekken van antilichamen tegen RSV.
- Beschrijving van de te hanteren criteria t.b.v. de go/no go beslissing.
- Uitwerking en onderbouwing van het experimental design (logistiek) en een berekening van de groepsgrootte die logisch aansluit bij het experimental design.
- Details m.b.t. de experimentele handelingen (randomiseren van de pups en al dan niet verdelen over verschillende moeders, tijdstip van vaccinatie van de pups, frequentie en volumina van bloedafnames bij moeders en pups).
- Risico inschatting van complicaties van de bloedafnames en de bewaking daarvan.
- Beschrijving van de te verwachten klinische verschijnselen na challenge.
- Opnemen van meer relevante en gevoelige HEP-criteria, afgestemd op type experiment en de desbetreffende dieren.
- Inschatting en beschrijving van het ongerief.
- Uitwerking van de 3 V's.
- Tekstueel en redactioneel (verduidelijking en onderlinge afstemming van bepaalde tekstpassages en correcte invulling van de verschillende documenten.

De vragen d.d. 22-09-2015 hadden betrekking op:

- Toelichting en onderbouwing van het experimental design v.w.b. de positieve controlegroep en de groep die gevaccineerd wordt t.b.v. het opwekken van antilichamen tegen RSV.
 - Redactioneel: m.b.t. illustratie van klinische symptomen bij punt J.
 - Redactioneel m.b.t. NTS: in overeenstemming brengen van de beschrijving van de doelstelling (bij punt 3.2) conform de titel van de NTS en de tekst bij 3.1.
- Datum antwoord: 01-09-2015 en 06-10-2015
 - 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.

Infectie met Respiratoir Syncytial Virus (RSV) speelt wereldwijd een belangrijke rol bij ziekte en sterfte als gevolg van een lagere luchtweginfectie. Infectie met RSV is wereldwijd verantwoordelijk voor jaarlijks meer dan 30 miljoen nieuwe gevallen van lagere luchtweginfecties bij kinderen jonger dan 5 jaar en jaarlijks ca. 3,4 miljoen ziekenhuisopnames in verband met een ernstige RSV besmetting. Ca. 90% van met RSV samenhangende sterftegevallen komen voor in landen met vooral midden- en lage inkomens. Profylactische en therapeutische behandeling met voor RSV-specifieke antilichamen is weliswaar effectief gebleken, maar is erg kostbaar en daardoor nauwelijks toegankelijk voor mensen in ontwikkelingslanden. Daarom is door de WHO een strategie voor vaccinontwikkeling voorgesteld, die zich enerzijds richt op immunisatie van moeders (en daarmee passieve immunisatie van babies) teneinde ziekteverschijnselen als gevolg van RSV te voorkomen bij babies jonger dan 6 maanden en anderzijds een actieve immunisatie van kinderen om RSV te voorkomen bij jonge kinderen op een leeftijd waarin immunisatie van de moeder geen of niet voldoende bescherming meer biedt.

Dit project heeft tot doel het ontwikkelen van een cavia diermodel voor het uittesten van vaccinatiemogelijkheden voor jonge kinderen tegen RSV. Maternale antilichamen, geïnduceerd door een RSV infectie of vaccinatie van de moederdieren, worden via de placenta actief aan de baby doorgegeven en kunnen zodoende beschermen tegen infectie op zeer jonge leeftijd. In de loop van de tijd nemen deze maternale antilichamen echter geleidelijk af, waardoor ze mogelijk niet meer voldoende bescherming bieden. Het is daarom van belang te onderzoeken of vaccinatie van zeer jonge kinderen ook mogelijk is in aanwezigheid van maternale antilichamen, zodat deze kinderen voldoende beschermd kunnen worden, ook wanneer ze niet of minder beschermd zijn door deze maternale antilichamen.

- 4.** De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Doel van het project is het opzetten van een caviamodel om de werkzaamheid van nieuw ontwikkelde RSV vaccins te onderzoeken in het geval van reeds bestaande immuniteit welke is opgewekt door overdracht van RSV-specifieke maternale

antilichamen (van moeder op pup). Uit eerder onderzoek is gebleken dat bij cavia's maternale antilichamen worden doorgegeven op een manier die vergelijkbaar is als bij mensen. Tevens zijn cavia's gevoelig voor RSV infectie, waardoor dit diermodel tevens bruikbaar is om in de toekomst de werkzaamheid van nieuwe vaccins te testen. De instelling heeft bovendien een ruime ervaring in het ontwikkelen van verschillende preklinische modellen.

5. Er is in wettelijk opzicht geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de dieren die een infectie ondergaan is maximaal matig. De overige dieren ondergaan maximaal licht ongerief als gevolg van bloedafnames en vaccinatie.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De cavia is de meest geschikte diersoort voor de beantwoording van de onderzoeksvraag. Voordat de werkzaamheid in proefdieren wordt getest, zijn vaccinkandidaten al in het laboratorium getest. Alleen veelbelovende kandidaten worden in proefdieren getest. Klinische studies mogen pas in mensen uitgevoerd worden als de veiligheid en werkzaamheid in diermodellen is bewezen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. De resultaten uit de eerste studie zullen gebruikt worden om de aantallen in toekomstige studies verder te berekenen. Hiermee wordt voorkomen dat onnodig te veel dieren worden gebruikt of te weinig dieren worden gebruikt, waardoor de resultaten van het experiment onbetrouwbaar worden. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat.
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. De dieren worden volgens de standaard gehuisvest. De meest ingrijpende handelingen worden uitgevoerd onder verdoving. Dieren die meer dan het verwachte ongerief (maximaal matig) ondergaan, worden uit het experiment genomen en zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10.

D

e 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.

RSV-infectie is wereldwijd verantwoordelijk voor een groot aantal ziekte- en sterfgevallen, vooral onder jonge kinderen en in ontwikkelingslanden. Een reeds beschikbare therapeutische en profylactische behandeling gebaseerd op toediening van antilichamen is weliswaar effectief maar zeer kostbaar en daardoor niet of slechts beperkt beschikbaar in deze landen.

Doel van dit project is een cavia diermodel te ontwikkelen voor het uittesten van de vaccinatiemogelijkheden tegen RSV in aanwezigheid van maternale antilichamen. Hiermee wordt een belangrijke stap gezet in het beschikbaar komen van een betaalbaar en goed werkzaam vaccin tegen RSV voor jonge kinderen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. Naar het oordeel van de DEC dient dit project dan ook een substantieel belang.

Tegenover dit substantiële belang staat het feit dat de dieren in deze experimenten gering en in sommige gevallen matig ongerief zullen ondervinden. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling zal worden gegeven 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 onvermijdelijk voor het realiseren van de beoogde doelstellingen.

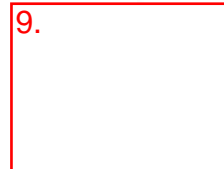
De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

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

5347 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
AVD905002015160

24 NOV. 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 16 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of a guinea pig model to study immunogenicity of RSV F vaccines in pups in the presence of RSV F-specific pre-existing immunity by maternal transfer of antibodies." met aanvraagnummer AVD905002015160. 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. Dit is een algemene voorwaarde. U kunt met uw project "Development of a guinea pig model to study immunogenicity of RSV F vaccines in pups in the presence of RSV F-specific pre-existing immunity by maternal transfer of antibodies." starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 november 2015 tot en met 1 oktober 2017. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie [redacted] gevoegd. Dit advies is bij de CCD ontvangen op 16 oktober 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 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 de


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: 5347 RE SCHAIJK
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 november 2015 tot en met 1 oktober 2017, voor het project "Development of a guinea pig model to study immunogenicity of RSV F vaccines in pups in the presence of RSV F-specific pre-existing immunity by maternal transfer of antibodies." met aanvraagnummer AVD905002015160, 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 20 oktober 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 oktober 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 oktober 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 oktober 2015, ontvangen op 16 oktober 2015.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|--|---------------|------------------|--|
| Development of a guinea pig model to study immunogenicity of RSV F vaccines in pups in the presence of RSV F-specific pre-existing immunity by maternal transfer of antibodies. | Cavia's (Cavia porcellus) / Dunkin Hartley (outbred SPF) | 380 | Matig / moderate | [REDACTED] beren, [REDACTED] zeugen en [REDACTED] nakomelingen |

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten instemming van de IvD krijgen.

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.

| Inventaris Wob-verzoek W17-05 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|--|------|
| nr. | document NTS nr 2015161 | 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 | NTS | x | | | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | | x | x | | x | | |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven 1 | | | | x | x | | x | | |
| 5 | Bijlage beschrijving dierproeven 2 | | | | x | x | | x | | |
| 6 | Bijlage beschrijving dierproeven 3 | | | | x | x | | x | | |
| 7 | Bijlage beschrijving dierproeven 4 | | | | x | x | | x | | |
| 8 | Verzoek om aanvullende informatie | | | | x | | x | x | | |
| 9 | Antwoord op verzoek om aanvullende informatie | | | | x | x | x | x | | |
| 10 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | | |
| 11 | DEC advies | | | | x | | x | x | | |
| 12 | adviesnota CCD | | x | | | | | | | x |
| 13 | Beschikking | | | | x | | x | x | | |

04 NOV. 2015



1.

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 1/161
 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 - 2018 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Preclinical model development for HRSV in ferrets
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van een preklinisch model voor onderzoek naar en testen van behandelings- en beschermingsstrategieën tegen Humaan Respiratoir Syncytieel Virus (HRSV) 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
-


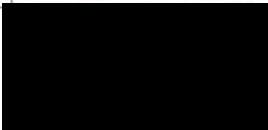
6 Ondertekening

- 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 |  |
| Functie | Vergunninghouder |
| Plaats | Schaijk |
| Datum | 3 - 7 - 2015 |
| Handtekening |  |



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: 3 november 2015

Betreft: Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD905002015161

Geachte heer / mevrouw,

Bijgaand de getekende aanvraag Projectvergunning Dierproeven AVD905002015161 met als titel:

Preclinical model development for HRSV in ferrets.

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

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]



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 the development of vaccine and antiviral formulations against human respiratory syncytial virus (HRSV), the applicant is aiming to establish a preclinical model that allows efficacy testing of these formulations. Once established, these models are subsequently made available to third parties (pharmaceutical companies, academia) to test newly developed vaccines and/or antiviral formulations.

These parties use the expertise of the applicant to select the relevant preclinical model that allows appropriate testing of their preparations.

HRSV infection and disease

Lower respiratory tract infections (LRTI) continue to be a major cause of death globally. Human respiratory syncytial virus (HRSV) plays an important role in LRTI mortality. It is estimated that about 40 million LRTI cases are associated with HRSV infections in the lower airways, of which more than 3 million require hospitalization. Annually, about 200,000 children below the age of 5 succumb to this infection, mainly in developing countries (██████████). WHO estimates global RSV disease burden to 64 million cases and 160,000 deaths every year (WHO, 2009). This makes HRSV the most important viral cause of severe LRTI in young children.

Like many other respiratory viruses, the incidence of HRSV shows seasonal fluctuations and peaks during winter in the northern and southern hemispheres or during the rainy season in tropical areas (██████████). HRSV is easily transmitted from one person to another, especially in conditions where people gather close together such as in day care centres, hospitals or nursing homes (██████████). At the age of two, the majority of children have at least been infected once with HRSV, not only because young children are susceptible, but also because immunity is short-lived. HRSV infection is the leading cause of hospitalization for children two to six months of age. The majority of HRSV infections remains confined to the upper respiratory tract, causing only common cold like symptoms. However, when the virus spreads to the lower respiratory tract it causes serious disease in up to 2% of them.

A number of groups have been identified that are at risk for developing LRTI upon infection with HRSV. These include premature newborns, young children with congenital heart and bronchopulmonary disease, immunocompromised people and the elderly. HRSV outbreaks are seen regularly in nursing homes. HRSV infection of immunocompromised people can result in persistent infection and ultimately even death. About 60 to 80% of bone marrow transplant patients do not survive HRSV induced pneumonia (██████████).

Since its identification in 1956, much effort has been made to reduce the global disease burden of HRSV. One of the major results has been the generation of a monoclonal antibody preparation that was shown to reduce hospitalization rates significantly upon prophylactic treatment of (prematurely born) children at risk of developing LRTI (██████████), but does not suppress the burden of disease in people with no apparent risk factors (██████████). Despite numerous attempts, there is currently no licensed HRSV vaccine available. Also, there is no proven effective standard of treatment of infected subjects with severe LRTI and support is mainly palliative.

HRSV animal models

Currently, the best available small animal model for HRSV is considered the cotton rat (*Sigmodon Hispidus*). In this model we have performed several successful studies. HRSV infected cotton rats, however, do not exhibit clinical signs of infection as they are known in humans (congested or runny nose, (dry) cough, low-grade fever). Furthermore, handling of cotton rats can be difficult and adult males need to be housed separately to prevent fighting. Another drawback of the cotton rat model is the limited availability of reagents for analysis purposes. Furthermore, transmission of HRSV between animals through direct contact could not be demonstrated in our experiments, while the virus is very contagious and easily transmitted between humans.

Mice are relatively insusceptible to HRSV infection, generally requiring 100-1000 times higher challenge doses compared to cotton rats in order to become productively infected. Not only does this not reflect physiologically relevant dosages, even at this dose the mouse model does not develop clinical signs of HRSV infection. African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) are considered to be the best nonhuman primate model (apart from chimpanzees, but these are not allowed to be used for research purposes by law), but this model has obvious ethical drawbacks. Also, their permissiveness to HRSV infection makes it difficult to obtain HRSV seronegative animals. Working with large numbers is difficult for both financial as well as housing reasons as they require specific housing conditions.

The ferret as an animal model for respiratory infections and disease

Ferrets (*Mustela putorius furo*) may offer new and previously unavailable means to study HRSV in vivo. Ferrets are considered the best preclinical/animal model for influenza research because of similar respiratory airways as in humans. Furthermore, ferrets develop clinical signs upon infection with influenza like cold-like symptoms (██████████). Also, models for transmission (██████████) and immunocompromised subjects have been developed for ferrets (██████████). Use of these models can provide new means to study (prevention and treatment of) HRSV infection. Previous studies have shown that both young as well as adult ferrets can be infected with HRSV (██████████), but times have

changed and so have housing, feeding and anaesthetics but most importantly the availability of more (clinically) relevant HRSV strains offers possibilities to conduct more clinically relevant preclinical studies. HRSV strains commonly used for infection studies in animal models are often so-called laboratory adapted strains that have an attenuated phenotype in vivo due to adaptive mutations acquired during serial passaging on cell lines. Since the source of the HRSV challenge stock used in the first infection studies in the 1970s cannot be traced, it is very likely that these have been laboratory adapted.

Recently, we showed that adult ferrets (one year of age) can be productively infected via the intranasal and intratracheal routes using a primary HRSV isolate for challenge. The replication kinetics were shown to closely resemble those known for HRSV infection of man. In addition, using an established ferret model for immunocompromised patients (██████████), it was shown that ferrets in which the immune system is impaired, prolonged virus shedding is observed, similar to HRSV infected patient groups in which immunity is impaired (██████████), who are typically at risk of developing respiratory complications upon RSV infection. The availability of the above mentioned ferret models to study transmission and infection in immunocompromised hosts renders the ferret a promising new model to study HRSV infection that may enable research and preclinical testing opportunities not available in other model systems for HRSV infection.

Therapeutic treatment

In the same ferret study, it was shown that the only currently available prophylactic treatment to reduce the impact of HRSV infection in the neonatal target groups, Palivizumab (██████████), could reduce and delay virus replication in a short term treatment schedule. Ribavirin has shown promising activity against RSV in vitro and in vivo. This drug when delivered by aerosol reduces the amount of RSV in lung tissues of experimentally infected cotton rats (██████████) and appears to ameliorate human infection with particularly striking improvement in arterial oxygen pressures in infected infants (██████████). However, subjective improvement is often subtle (██████████). Combination of ribavirin with another agent particularly IVIG, might provide improved protection against RSV infection. This combination has been utilized in immunocompromised patients with severe RSV disease, including hematopoietic stem cell and lung transplant recipients. This treatment combination was associated with decreased mortality in these patients (██████████). Cotton rat models have demonstrated decreased lung viral titers after combination treatment with IVIG and ribavirin, as compared to treatment with placebo or either agent alone (██████████).

Vaccine-induced enhanced disease

In clinical studies performed in the 1960's (██████████), children vaccinated with a vaccine preparation inactivated by formalin treatment, were shown to be more vulnerable to develop LRTD than those vaccinated with a control preparation, resulting in hospitalization rates of up to 80% in vaccinees and two fatalities. The experience with the formalin-inactivated RSV (FI-RSV) vaccine was of consequence primarily because atypical disease was observed in a significant number of seronegative infants on subsequent exposure to virus. This specific atypical HRSV disease was subsequently coined vaccine-induced enhanced disease. Speculation on the mechanism of disease potentiation by the inactivated RSV vaccine has centred on several possible aberrations of the immune response to vaccine that involve an imbalance between or within various compartments of the immune system. Nonetheless, immunological analysis of sera and peripheral mononuclear cells from the FI-RSV vaccine recipients and studies in rodents supported the notion that type 2 (TH2) helper T-cell responses were involved. Hence, the prevailing hypothesis is that inactivated non-replicating or subunit vaccines that induce primarily TH2 helper T-cell responses are contraindicated as vaccines for RSV.

Development of a ferret model for HRSV infection and disease

The studies described in this project proposal are aimed to further develop the HRSV/ferret model: First, studies will be performed to establish optimal administration dose, route and infection kinetics of a clinically relevant, recent HRSV strain in healthy and immunocompromised ferrets (to allow future testing of intervention strategies in specific target groups).

Having established the above parameters, the following studies are performed to a) establish the HRSV/ferret model to study treatment options of HRSV infected subjects using healthy and immunocompromised ferrets and b) to determine FI-RSV vaccine induced enhanced disease in ferrets to establish a model to study the safety profile of newly developed candidate vaccines, as these vaccines will have to be tested to demonstrate they will not induce this severe adverse effect.

Upon completion of the studies described in the project, a preclinical model for HRSV infection and disease has been established that allows assessment of prophylactic and therapeutic antiviral intervention strategies in settings that are not available in rodent animal models currently in use. As the

ferret's respiratory organs and tissues more closely resemble those in man than those of rodents, the context in which these studies can be performed gains relevance in this new preclinical model. Furthermore, observations of clinical signs and transmission of the virus from infected to naïve animals allows testing of new intervention strategies aimed at prevention/reduction of transmission – a strategy that has remained unexplored for HRSV. In addition, the establishment of the HRSV infection model in immunocompromised ferrets allows assessment of intervention strategies specifically for high risk patient groups in which the immune system is in one way or the other not working optimally, i.e. in premature newborns, young children with congenital heart and bronchopulmonary disease, immunocompromised people (i.e. transplant recipients, those treated for autoimmune diseases, etc.) and the elderly.

This new and relevant preclinical model for HRSV infection will subsequently be made available for pharmaceutical companies to test newly developed HRSV specific intervention strategies (antivirals, antibody preparations, vaccines) and also for academic institutions that wish to address scientific issues in this model.

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 objective of the studies described in this project proposal is to establish the ferret as a preclinical model for HRSV infection that can be used to assess the potential of HRSV specific antiviral intervention strategies in general as well as for specific target groups.

In order to achieve this objective, the following needs were identified for which the specific studies were designed:

- Determination of optimal infectious dose of a clinically relevant HRSV isolate in healthy and immunocompromised ferrets
This is achieved in study 1. In a previous study, both healthy and immunocompromised ferrets were shown to be susceptible to the HRSV isolate that will be used in these studies.
- Establish a clinical scoring system for healthy and immunocompromised ferrets.
This is achieved in study 1. The previous study in these animals using the same HRSV isolate clinical signs were observed in individual animals. Close monitoring of groups of animals infected with a dose range of HRSV will result in an elaborate set of clinical data.
- Assessment of HRSV transmission in healthy and immunocompromised ferrets.
As clinical signs (sneezing) were observed in individual animals in the previous study, this suggests a potential for transmission. An experimental setup involving infected and naïve ferrets in study 1 allows proper assessment of transmission in this animal model.
- Determination of the virus replication and dissemination kinetics in healthy and immunocompromised ferrets.
Since the preliminary study showed healthy and immunocompromised ferrets were susceptible to HRSV infection, this objective is achieved by studying the time-course of infection in these animals in study 2.
- Assessment of therapeutic treatment of HRSV infection in ferrets.
The preliminary study showed an inhibitory effect of Synagis (a registered antibody preparation used for HRSV prophylaxis in newborn target groups) on HRSV replication in ferrets. This objective will be achieved in study 3 which will assess efficacy of the treatment regimen currently most often used to treat HRSV infections, a combination of IVIG and ribavirin.
- Assessment of enhanced disease after vaccination with formalin-inactivated (FI) HRSV vaccines
As the preliminary study showed ferrets to be susceptible to the HRSV isolate to be used, including similar pathological effects as seen in humans, this objective will be achieved in study 4 in which the extent of enhanced disease is determined by infecting vaccinated animals with HRSV and assessing virus loads, pathology and potential clinical signs.

These studies are performed by the applicant to fill a gap in the availability of preclinical models of HRSV that enable testing of antiviral intervention strategies that are being developed by third parties. The expertise of the applicant in HRSV research both in in vitro as well as in in vivo systems has resulted in publications in peer-reviewed journals and presentations at international symposia. This expertise will enable the establishment of the proposed preclinical model of HRSV that will facilitate the development of

new and/or improved antiviral intervention strategies.

3.3 Relevance

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

Global burden

HRSV infections are responsible for a significant global disease burden, as it is estimated that about 40 million LRTI cases are associated with HRSV infections in the lower airways, of which more than 3 million require hospitalization. Annually, about 200.000 children below the age of 5 succumb to this infection, mainly in developing countries (██████████). WHO estimates the global RSV disease burden to 64 million cases and 160000 deaths every year (WHO, 2009).

HRSV infections induce no complete immunity and reinfections are common and occur regularly throughout life. In healthy adults the symptoms are mild (congested or runny nose, (dry) cough, low-grade fever) and the infection remains localized to the upper airways. In young children, elderly and immunocompromised people infections with HRSV can spread to the lower airways, inducing more severe clinical symptoms (fever, severe cough, wheezing, rapid of difficulty breathing). In children these episodes are associated with induction of chronic airway disorders such as asthma and recurrent wheezing. These cases also have an economic impact since these severe cases result in absenteeism of affected parents.

Need for vaccines and antiviral compounds

New antiviral compounds for treatment of HRSV (disease) and vaccine(s) that are able to provide prophylaxis for all concerned target groups mentioned above, are necessary to reduce morbidity and mortality in these risk groups and to reduce the economic impact associated with HRSV infection and disease.

Gap: lack of an animal model for clinical disease, transmission and immunocompromised hosts

The establishment and further development of the ferret models that are the subject of this project proposal will subsequently be made available to pharmaceutical companies to help support the development of these new and improved treatment options by allowing assessment of efficacy and safety profiles in a preclinical setting. Furthermore, academic institutions that wish to address scientific issues in this model will be involved in collaborative efforts to pursue these issues.

The establishment of the ferret/HRSV model would provide additional features in preclinical testing studies that are difficult or even impossible to perform in currently available animal models of HRSV infection. As the ferret's respiratory organs and tissues more closely resemble those in man than those of rodents, the context in which these studies can be performed gains relevance in this new preclinical model. Furthermore, observations of clinical signs and transmission of the virus from infected to naïve animals allows testing of new intervention strategies aimed at prevention/reduction of transmission – a strategy that has remained unexplored for HRSV. In addition, the establishment of the HRSV infection model in immunocompromised ferrets allows assessment of intervention strategies specifically for high risk patient groups in which the immune system is in one way or the other not working optimally, i.e. in premature newborns, young children with congenital heart and bronchopulmonary disease, immunocompromised people (i.e. transplant recipients, those treated for autoimmune diseases, etc.) and the elderly. These features are not available in animal models currently in use, are considered important for the development of future intervention strategies, and have been identified as a programmatic gap (██████████).

3.4 Research strategy

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

The purpose of the studies described in this project proposal is to establish the ferret as a preclinical model for HRSV infection of that can be used to assess the potential of HRSV specific antiviral intervention strategies. In a study we recently performed it was shown that ferrets can be infected with HRSV. Infection of healthy animals resulted in virus replication kinetics similar to those in cotton rats, which were tested in parallel and are currently considered the standard preclinical model to study HRSV prophylactic treatments. In addition, in a ferret model for immune deficiency, extended replication was observed.

The current proposal builds on that study to establish the ferret/HRSV infection and disease model

through a series of studies (1 to 4) that together fulfill the requirements for the establishment of an HRSV preclinical model that enables studies into prevention and treatment (i.e. intervention) strategies against HRSV infections in general and in high-risk target groups in particular (immunodeficient populations).

Therefore, to establish this preclinical model the studies are performed on both healthy and immunocompromised ferrets. The former to set up a general preclinical model for HRSV infection, the latter represent specific high risk groups for HRSV infection for which no specific model is available: premature newborns, young children with congenital heart and bronchopulmonary disease, immunocompromised people (i.e. transplant recipients, those treated for autoimmune diseases, etc.) and the elderly.

Study 1

- Determine the optimal challenge dose of a clinically relevant HRSV isolate
 - Intranasally: simulation of natural route of infection through respiratory tissues in the nose. Future challenge route for efficacy studies of vaccine preparations.
 - Intratracheally: simulation of natural route of infection through respiratory tissues in the lower airways. Future challenge route for efficacy studies of antiviral compounds that target the lung, specific antibody preparations, etc.
- Develop a clinical scoring system to be used for future efficacy studies for treatment options, may also be used to fine tune humane endpoints for future use.
- Assessment of the potential of transmission to allow future studies aimed at prevention/intervention of transmission.

Study 2

- Assess the time-course of HRSV infection to determine the optimal end point for future anti-HRSV treatment studies (based on virological and/or pathological parameters)

Study 3

- Assess the potential to study therapeutic treatment strategies
Designed to reflect the treatment currently mostly used in clinical settings, a combination of a polyclonal anti-RSV antibody preparation (IVIG) and the antiviral Ribavirin. Its efficacy will be tested with the optimal dose determined in study 1.

Study 4

- Assess extent of vaccine-induced enhanced disease, a severe adverse effect shown to be induced in clinical studies in the 1960s
Reproduce these findings in the ferret to allow safety testing of future vaccine preparations by assessing the risk of vaccine-induced enhanced disease in a preclinical model.

Taken together, the above studies are aimed to establish the ferret/HRSV model as an asset to currently available models that allows preclinical testing of HRSV specific antiviral intervention strategies in contexts that are currently not available.

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.

1. Dose Finding, clinical signs and transmission of HRSV in ferrets
Animal procedures: weighing, intraperitoneal implantation of data loggers under anaesthesia and using analgesia, oral administration of immune suppressants and antibiotics, sampling of blood, nose and throat under anaesthesia, intranasal or intratracheal challenge infection under anaesthesia, co-habitation of naïve and infected animals, euthanasia, necropsy for pathological assessment and collection of organs and tissues.
2. Time Course of HRSV infection in Ferrets
Animal procedures: weighing, intraperitoneal implantation of data loggers under anaesthesia and

using analgesia (optional), oral administration of immune suppressants and antibiotics, sampling of blood, nose and throat under anaesthesia, intranasal or intratracheal challenge infection under anaesthesia, euthanasia, necropsy for pathological assessment and collection of organs and tissues.

3. Assessment of therapeutic treatment of HRSV infection in ferrets
Animal procedures: weighing, intraperitoneal implantation of data loggers under anaesthesia and using analgesia (optional), oral administration of ribavirin or PBS, administration of IVIG, sampling of blood, nose and throat under anaesthesia, intranasal or intratracheal challenge infection under anaesthesia, euthanasia, necropsy for pathological assessment and collection of organs and tissues.
4. Assessment of enhanced disease after vaccination with formalin-inactivated (FI) HRSV vaccines
Animal procedures: weighing, intraperitoneal implantation of data loggers under anaesthesia and using analgesia (optional), i.m. administration of FI-vaccine, sampling of blood, nose and throat under anaesthesia, intranasal or intratracheal challenge infection under anaesthesia, bronchoalveolar lavage (BAL), euthanasia, necropsy for pathological assessment and collection of organs and tissues.

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.

1. Dose Finding, clinical signs and transmission of HRSV in ferrets
 - This component identifies optimal doses for HRSV infection of healthy and immunocompromised ferrets for the intranasal and intratracheal administration routes, which will be used for studies **2**, **3** and **4** (selection points).
 - Furthermore, it will result in a clinical scoring system for HRSV induced clinical signs in infected healthy and immunocompromised ferrets, which will be used for studies **2**, **3** and **4**. If HRSV infection does not result in temperature changes that deviate from normal, subsequent studies 2 and 3 will not require use of data loggers (selection point).
 - Also, it allows evaluation of an important feature currently not available in other preclinical HRSV models: transmission of infection. Establishment of transmission would allow for new HRSV intervention methods to be tested in future studies which would be a unique feature currently not available in other preclinical models.
 - Finally, it allows generation of a homologous IVIG preparation that can be used to test efficacy of this treatment regimen in combination with an antiviral in study **3**. A homologous preparation is preferred since human antibody preparation have a limited half life in ferrets.
2. Time Course of HRSV infection in Ferrets
This component identifies the optimal end points for histopathological analysis of infected healthy and immunocompromised ferrets, which will be used for studies **3** and **4**, but will also be used for future preclinical studies aimed at testing new HRSV intervention strategies. The optimal challenge doses to be used for this study will be selected based on the results of study **1**.
3. Assessment of therapeutic treatment of HRSV infection in ferrets
This component determines the efficacy of the most commonly used treatment regimen against HRSV in hospitalized risk groups and helps to establish the ferret model of HRSV disease in which new treatment options can be assessed in future studies. The optimal challenge doses and endpoint to be used for this study will be selected based on the results of study **1** and **2**.
4. Assessment of enhanced disease after vaccination with formalin-inactivated (FI) HRSV vaccines
This component assesses the occurrence and extent of FI-HRSV vaccine induced enhanced disease in the ferret model, which will allow assessment of the safety profile of newly developed HRSV vaccines in this preclinical model. The optimal challenge doses and endpoint to be used for

this study will be selected based on the results of study **1** and **2**.

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 | Dose Finding, clinical signs and transmission of HRSV in ferrets |
| 2 | Time Course of HRSV infection in Ferrets |
| 3 | Assessment of therapeutic treatment of HRSV infection in ferrets |
| 4 | Assessment of enhanced disease after vaccination with formalin-inactivated (FI) HRSV vaccines |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |

Appendix 1

Dose finding and Transmission of HRSV in ferrets

| Group | No. | Immune status | Titer | Infection route | Day | | | | | | | |
|-------|-----|---------------|-------|-----------------|----------|-----|------------|--------|-----------|--------------|-----------|-------------|
| | | | | | D -18 | D-4 | D- 3 to -1 | D0 | D1 to 3 | D4 to 9 | D10 to 20 | D21 |
| 1 | ■ | Healthy | 10-3 | IN | DL, B, A | - | - | IN | NS/TS | NS/TS | NS/TS | NS/TS, B, N |
| 2 | ■ | Healthy | 10-4 | IN | DL, B, A | - | - | IN | NS/TS | NS/TS | NS/TS | NS/TS, B, N |
| 3 | ■ | Healthy | 10-5 | IN | DL, B, A | - | - | IN | NS/TS | NS/TS, T | NS/TS | NS/TS, B, N |
| 4 | ■ | Healthy | 10-3 | IT | DL, B, A | - | - | IT | NS/TS | NS/TS | NS/TS | NS/TS, B, N |
| 5 | ■ | Healthy | 10-4 | IT | DL, B, A | - | - | IT | NS/TS | NS/TS | NS/TS | NS/TS, B, N |
| 6 | ■ | Healthy | 10-5 | IT | DL, B, A | - | - | IT | NS/TS | NS/TS, T | NS/TS | NS/TS, B, N |
| 7 | ■ | IC | 10-3 | IN | DL, B, A | AB | IM | IM, IN | IM, NS/TS | IM, NS/TS | IM, NS/TS | NS/TS, B, N |
| 8 | ■ | IC | 10-4 | IN | DL, B, A | AB | IM | IM, IN | IM, NS/TS | IM, NS/TS | IM, NS/TS | NS/TS, B, N |
| 9 | ■ | IC | 10-5 | IN | DL, B, A | AB | IM | IM, IN | IM, NS/TS | IM, NS/TS, T | IM, NS/TS | NS/TS, B, N |
| 10 | ■ | IC | 10-3 | IT | DL, B, A | AB | IM | IM, IT | IM, NS/TS | IM, NS/TS | IM, NS/TS | NS/TS, B, N |
| 11 | ■ | IC | 10-4 | IT | DL, B, A | AB | IM | IM, IT | IM, NS/TS | IM, NS/TS | IM, NS/TS | NS/TS, B, N |
| 12 | ■ | IC | 10-5 | IT | DL, B, A | AB | IM | IM, IT | IM, NS/TS | IM, NS/TS, T | IM, NS/TS | NS/TS, B, N |

| Transmissior | No. | Immune status | Titer | Infection route | D-18 | D -4 | D -3 to -1 | D0 to 5 (Transmission) | D6 to 20 | D21 |
|--------------|-----|---------------|-------|-----------------|------|------|------------|------------------------|-------------|-------------|
| | | | | | 13 | ■ | Healthy | - | DL, B, A | |
| 14 | ■ | Healthy | - | DL, B, A | | | T, NS/TS | NS/TS | NS/TS, B, N | |
| 15 | ■ | IC | - | DL, B, A | | AB | IM | T, IM, NS/TS | IM, NS/TS | NS/TS, B, N |
| 16 | ■ | IC | - | DL, B, A | | AB | IM | T, IM, NS/TS | IM, NS/TS | NS/TS, B, N |

Abbreviations:

IC: Immune Compromised; DL: Data logger implantation; W: weight; IM: administration immune suppressants and antibiotics; AB: Antibiotics;

IN/IT: intranasal / intratracheal challenge; NS: nose swab; TS: Throat Swab; B: blood; N: necropsie; A: Analgesia; T: Healthy animals housed with inoculated animal (1:1)

Transmission: In this study, ■ recipient animals (groups 13 - 16) will be housed together 1:1 with ■ donor animals that will be taken from groups 3, 9, 6 and 12, respectively.

After co-habitation, the donor animals will be returned to their respective groups.

On Day -18 and from Day 0 (Day -4 for IC animals) animals will be weighed and checked on a daily basis.

Appendix 2

Time Course of HRSV in ferrets

| Group | No. | Immune status | infection route | Titer | Day | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|---------------|-----------------|--------|-------|-----|------------|--------|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----|-------------|
| | | | | | D -18 | D-4 | D-3 to D-1 | D0 | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | D8 |
| 1 | ■ | Healthy | IN | T.B.D. | DL | B | | IN | | NS/TS, B ,N | | | | | | |
| 2 | ■ | Healthy | IN | T.B.D. | DL | B | | IN | | | NS/TS, B ,N | | | | | |
| 3 | ■ | Healthy | IN | T.B.D. | DL | B | | IN | | | | | NS/TS, B ,N | | | |
| 4 | ■ | Healthy | IN | T.B.D. | DL | B | | IN | | | | | | | | NS/TS, B ,N |
| 5 | ■ | Healthy | IT | T.B.D. | DL | B | | IT | | NS/TS, B ,N | | | | | | |
| 6 | ■ | Healthy | IT | T.B.D. | DL | B | | IT | | | NS/TS, B ,N | | | | | |
| 7 | ■ | Healthy | IT | T.B.D. | DL | B | | IT | | | | | NS/TS, B ,N | | | |
| 8 | ■ | Healthy | IT | T.B.D. | DL | B | | IT | | | | | | | | NS/TS, B ,N |
| 9 | ■ | IC | IN | T.B.D. | DL | AB | IM | IM, IN | IM | NS/TS, B ,N | | | | | | |
| 10 | ■ | IC | IN | T.B.D. | DL | AB | IM | IM, IN | IM | IM | IM | NS/TS, B ,N | | | | |
| 11 | ■ | IC | IN | T.B.D. | DL | AB | IM | IM, IN | IM | IM | IM | IM | IM | NS/TS, B ,N | | |
| 12 | ■ | IC | IN | T.B.D. | DL | AB | IM | IM, IN | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | NS/TS, B ,N |
| 13 | ■ | IC | IT | T.B.D. | DL | AB | IM | IM, IT | IM | NS/TS, B ,N | | | | | | |
| 14 | ■ | IC | IT | T.B.D. | DL | AB | IM | IM, IT | IM | IM | IM | NS/TS, B ,N | | | | |
| 15 | ■ | IC | IT | T.B.D. | DL | AB | IM | IM, IT | IM | IM | IM | IM | IM | NS/TS, B ,N | | |
| 16 | ■ | IC | IT | T.B.D. | DL | AB | IM | IM, IT | IM | IM | IM | IM | IM | IM | IM | NS/TS, B ,N |
| 17 | ■ | Control | IN | T.B.D. | DL | B | | V | | | | | | | | NS/TS, B ,N |
| 18 | ■ | Control | IT | T.B.D. | DL | B | | V | | | | | | | | NS/TS, B ,N |

Abbreviations:

W: weight; IM: administration immune suppressants and antibiotics; AB: administration antibiotics; IN/IT: intranasal / intratracheal challenge; NS: nose swab; TS: Throat Swab; B: blood; DL: Data logger implantation (grey: optional); N: necropsy; IN: intranasal; IT: intratracheal; V: IN/IT vehicle; T.B.D.: to be determined (in the dose-finding study)

Healthy animals will be weighed on Day -4 and from Day 0 daily. IC animals will be weighed from D-4 daily

Appendix 3

RSV Challenge, treatment & Sampling Schedule

| | | RSV Challenge, treatment & Sampling Schedule* | | | | | | |
|---------|-----|---|--|----------|-----------|----------|--------------|--------------------------------|
| Group | No. | d -X** | d 0 | d X | d X' | d X'-X'' | d X''' | |
| 1 | ■ | B, TS,W | Intranasal and /or intratracheal challenge with RSV K1454*** | CS and W | Ribavirin | IVIG | CS, W, and S | CS, W, S,T, LW, necropsy |
| 2 | ■ | B, TS,W | | CS and W | PBS | PBS | | |
| HOUSING | | NORMAL | | | | | | |

* Ferrets seronegative for Aleutian Disease and RSV will be brought into the animal facility (standard housing).

** At least 14 days before day 0, temperature probes are implanted and blood is taken to determine the RSV specific serological status

*** The optimal doses will be determined in the dose finding study

d X, X', X'', and X''' are determined in the Time course study, but will not be later than 14 days after infection

Abbreviations: d = day; B = whole blood for serum; S = throat & nose swabs; T = lung and nasal turbinate tissue; TS = temperature sensor implantation; W = body weight; LW = lung weight; CS = clinical scores; IVIG = Intravenous immunoglobuline

Appendix 4

| RSV vaccination, challenge, & Sampling Schedule | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|---------|-------------------------------------|----------------|----------|----------|----------------|----------|----------|-------------------------------|---------------|-------------|--|---------------|-----------------------------|
| Group | No. | d -X** | RSV vaccination & Sampling Schedule | | | | | | | Challenge & Sampling Schedule | | | | | |
| | | | d 0 | d 14 | d 28 | d 42 | d 56 | d 70 | d 84 | d X-X' | d X'' | d 0 | d X-X' | d X'' | |
| 1 | ■ | B, TS,W | CS, W, B | FI-vaccination | CS, W, B | CS, W, B | FI-vaccination | CS, W, B | CS, W, B | FI-vaccination | CS, W, B, BAL | CS, W, B, S | Intranasal and /or intratracheal challenge with RSV K1454*** | CS, W, B, BAL | CS, W, S,T, B, LW, necropsy |
| 2 | ■ | B, TS,W | CS, W, B | RSV priming | CS, W, B | CS, W, B | RSV priming | CS, W, B | CS, W, B | RSV priming | CS, W, B, BAL | CS, W, B, S | | CS, W, B, BAL | |
| 3 | ■ | B, TS,W | CS, W, B | PBS | CS, W, B | CS, W, B | PBS | CS, W, B | CS, W, B | PBS | CS, W, B, BAL | CS, W, B, S | | CS, W, B, BAL | |
| HOUSING | | NORMAL | | | | | | | | | | | | | |

* Ferrets seronegative for Aleutian Disease and RSV will be brought into the animal facility (standard housing).

** At least 14 days before day 0, temperature probes are implanted and blood is taken to determine the RSV specific serological status


*** The optimal doses will be determined in the dose finding study

d X, X', and X'' are determined in the Time course study

Abbreviations: d = day; B = whole blood for serum; S = throat & nose swabs; T = lung and nasal turbinate tissue; TS = temperature sensor implantation; W = body weight; LW = lung weight; FI = formalin-inactivated RSV vaccine, CS= clinical scores; BAL= bronchoalveolar lavage



> 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.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015161

Datum 2 december 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte [REDACTED],

Op 4 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Preclinical model development for HRSV in ferrets' met aanvraagnummer AVD905002015161. 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:

Onduidelijkheden

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van fretten. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is alleen dieren van een geslacht te gebruiken?

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. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk donderdag, 3 december 2015, uw antwoord aan ons te sturen.

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.

Datum

2 december 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD905002015161

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

Betref: Verzoek om aanvullende informatie voor projectaanvraag AVD905002015161: "Preclinical model development for HRSV in ferrets"

Datum: 2 december 2015

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

Met referentie naar uw verzoek om aanvullende informatie ontvangen op 2 december 2015 stuur ik u hierbij mijn antwoord op de vraag gesteld in uw schrijven.

Vraag:

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van fretten. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan onderbouwen waarom het belangrijk is alleen dieren van een geslacht te gebruiken?

Antwoord:

Uiteraard ondersteunen wij de visie van de CCD dat het gebruik van beide geslachten in dierproeven in bepaalde gevallen kan leiden tot vermindering van het onnodig doden van surplus dieren van een bepaald geslacht. Echter voor het gebruik van bepaalde species en zeker binnen dit project waarvoor fretten worden gebruikt is er geen sprake van fokoverschot. zie de bijgevoegde brief van de leverancier van de fretten als Bijlage A). Aanvullende argumenten, zoals die uitgebreid zijn verwoord in ons bezwaar inzake project AVD905002015142 (als "16Nov2015 bezwaar CCD project AVD905002015142 final nov 17.docx" via de SFTP Dienst aangeleverd aan de CCD op 17 november, de inhoud hiervan is als Bijlage B aan deze brief toegevoegd), om niet in individuele experiment en fretten van beide geslachten te gebruiken zijn:

- Beschikbaarheid van de dieren (van een bepaald geslacht);
- Eerder uitgevoerde experimenten waarmee vergeleken dient te worden;
- Bepaalde keuze van geslacht vanuit wetenschappelijk of regelgevend oogpunt.

Bij het aanvragen van de verschillende dierproeven zal toezicht gehouden worden (door middel van toetsing van werkprotocollen inclusief de rechtvaardiging voor het geslacht bij IvD) over het gelijkwaardig gebruik van de verschillende geslachten tussen de dierproeven.

Ik hoop u hiermede voldoende te hebben geïnformeerd om de beoordeling van dit projectvoorstel af te ronden.

Met vriendelijke groeten,

[Redacted signature]

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

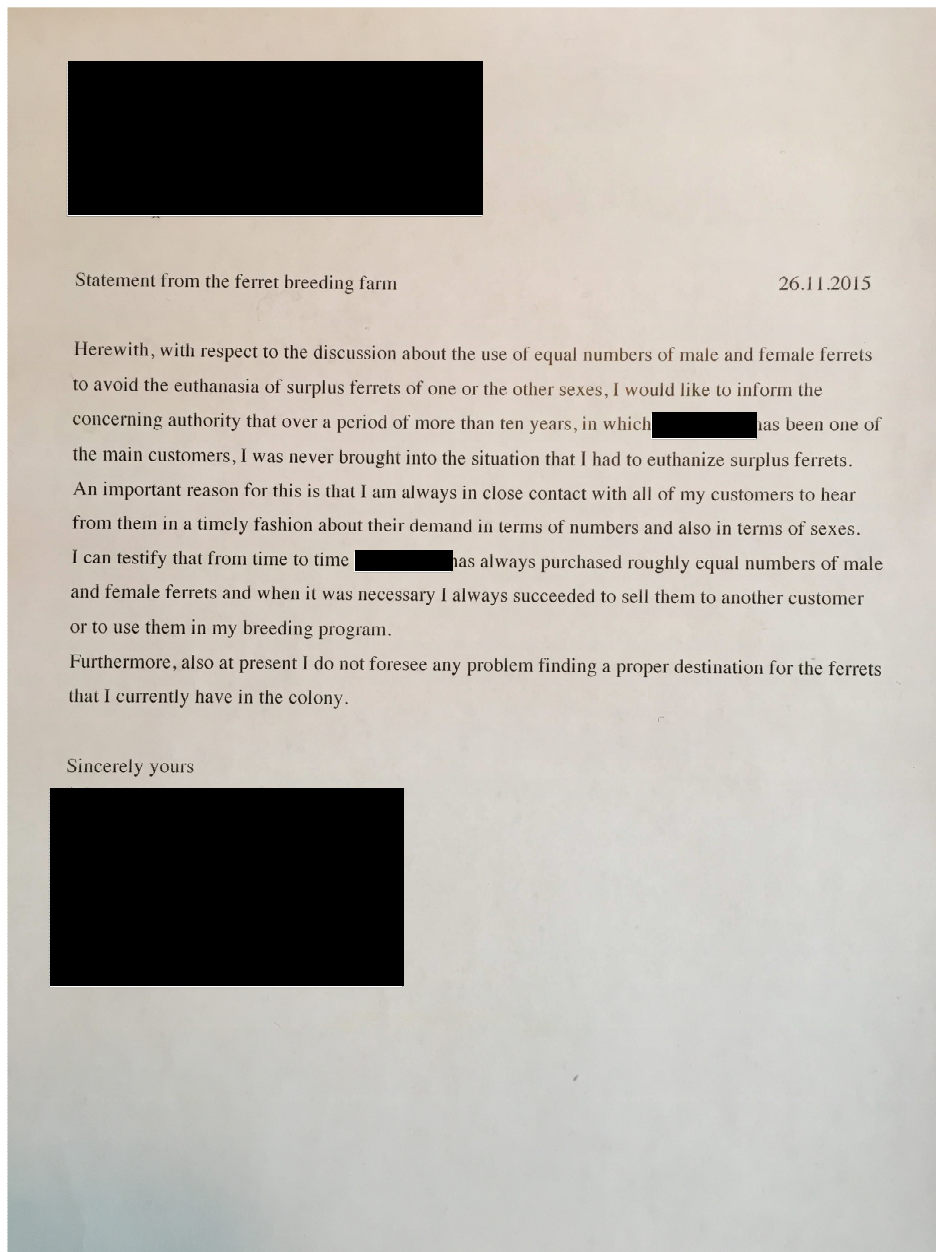
[Redacted contact information]

Bijlagen:

- A. Brief van de frettenleverancier
- B. Inhoud bezwaarschrift "16Nov2015 bezwaar CCD project AVD905002015142 final nov 17.docx"

Bijlage A

Brief van de frettenleverancier



Bijlage B

Inhoud bezwaarschrift "16Nov2015 bezwaar CCD project AVD905002015142 final nov 17.docx"

To: CCD
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Date: 16 november 2015

RE: Bezwaarschrift tegen beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven AVD905002015142, afgegeven d.d. 2 november 2015.

Cc: [REDACTED] Viroclinics Biosciences B.V.
IvD BioXpert B.V.

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Op 2 november 2015 ontvingen we uw beslissing over projectaanvraag AVD905002015142, getiteld 'Het testen van de effectiviteit van influenza vaccins al dan niet met een adjuvans tegen infectie met influenza virus in fretten'. In uw beslissing stelt u de volgende voorwaarde:

"In alle dierproeven worden mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt, tenzij vanuit regulatorio oogpunt anders wordt geëist. Zo doende wordt voorkomen dat surplus dieren 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."

Ten eerste betreur ik, als vergunninghouder, het feit dat er geen vragen zijn gesteld over het gebruik van beide geslachten terwijl de CCD wel andere vragen heeft gesteld bij de beoordeling van dit projectvoorstel. Daarnaast betreur ik het feit dat ondanks eerdere beloften (bijeenkomst in september van de CCD met vergunninghouders en bespreking van de CCD met 3 vergunninghouders in oktober) er geen gebruik gemaakt is van ruimte om met de vergunninghouder te overleggen over de impact van de eventueel op te leggen voorwaarde.

Uiteraard ondersteunen wij de visie van de CCD dat het gebruik van beide geslachten in dierproeven in bepaalde gevallen kan leiden tot vermindering van het onnodig doden van surplus dieren van een bepaald geslacht. Echter voor het gebruik van bepaalde species en zeker binnen dit project waarvoor fretten worden gebruikt is er geen sprake van fokoverschot. De afnemers van fretten bij deze leverancier, waartoe de aanvrager ook behoort, gebruiken allen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren (ter informatie zie ook de bijlage waarin verschillende gepubliceerde studies zijn aangehaald met ofwel mannelijke ofwel vrouwelijke dieren). Gezien de levensduur van de dieren en de tijdspanne waarin de dieren voor experimenten gebruikt worden (6 – 24 maanden), worden er geen dieren op voorraad gedood.

Wij realiseren ons dat binnen de huidige aanvraag het geslacht van de dieren niet gedefinieerd is, echter de keuze van het geslacht zal meegenomen in de aanvraag van de verschillende dierproeven die uitgevoerd zullen worden binnen dit project en deze keuze zal ook voorgelegd en beoordeeld worden door de IvD. Hierin zullen de onderstaande overwegingen meegenomen worden, niet gerangschikt op basis van prioriteit in de overweging:

- Beschikbaarheid van de dieren (van een bepaald geslacht);
- Eerder uitgevoerde experimenten (al dan niet uitgevoerd door de aanvrager of gecommuniceerd door de opdrachtgever aan de aanvrager) waarmee vergeleken dient te worden;
- Bepaalde keuze van geslacht vanuit wetenschappelijk of regelgevend oogpunt.

Bij het aanvragen van de verschillende dierproeven zal toezicht gehouden worden (door middel van toetsing van werkprotocollen inclusief de rechtvaardiging voor het geslacht bij IvD) over het gelijkwaardig gebruik van de verschillende geslachten tussen de dierproeven.

Los van bovenstaande argumenten willen wij nog toevoegen dat voor experimenten waarbij ook inperking een belangrijke factor is (BSL klasse II of III) een logistiek probleem is in het uitvoeren van dierproeven met beide geslachten. Zoals in de bijlage benoemd zullen de experimenten onder zeer gecontroleerde omstandigheden uitgevoerd worden, waarbij bij experimenten met influenza virus altijd gebruik gemaakt wordt voor de hoogst mogelijke inschaling BSL III (en dus isolator huisvesting) in verband met aerosol transmissie tussen groepen maar ook van dieren naar onderzoekers/biotechnici. Per isolator kan maar één sexe worden gehuisvest. Om dieren die behandeld worden met verschillende preparaten met elkaar te kunnen vergelijken, dient de challenge conditie gelijk te zijn tussen de groepen. Echter, bij aparte huisvesting van mannelijke en vrouwelijke dieren is dit logistiek niet meer mogelijk en wordt een extra variabele geïntroduceerd in het experiment (zogenaamde inter-assay of inter-pen variatie) zodat de groepsgrootte zal toenemen. In het kader van vermindering proefdieren lijkt ons dat niet gewenst.

Wij verzoeken u hierbij dan ook om de beslissing van de CCD aangaande aanvraag AVD905002015142 te heroverwegen en toestemming te verlenen tot het gebruik van één en hetzelfde geslacht binnen een enkele dierproef met de opmerking dat binnen het gehele projectvoorstel (maar ook tussen verschillende projectvoorstellen) wel degelijk een gelijk gebruik (indien van toepassing op basis van beschikbaarheid) is van mannelijke en vrouwelijke dieren, echter in afzonderlijke dierproeven en niet binnen de dierproeven zelf.

Met vriendelijke groet,

████████████████████
Vergunninghouder BioXpert B.V.

Bijlage 1: aanvullende informatie betreffende bezwaarschrift

Bijlage 1:

Zeer recent zijn er meerdere artikelen gepubliceerd waarin het gebruik van beide geslachten geadviseerd wordt, dit onder andere om variatie tussen de geslachten in een vroeg stadium al te onderzoeken, maar ook om het onnodig doden van surplus dieren tegen te gaan.

Echter, voor de dierproeven die uitgevoerd worden binnen deze aanvraag is dit niet van toepassing. Het betreffen hier proof-of-concept studies waarin de effectiviteit van een bepaald vaccinatie regime bestudeerd wordt onder zeer gecontroleerde omstandigheden (in dit geval de uiteindelijke challenge van dieren, die gebruikt wordt om de effectiviteit van de behandeling te bestuderen). Deze gecontroleerde omstandigheden zijn in eerdere experimenten onderzocht en gevalideerd voor een groot aantal verschillende influenza virussen. Op basis van toenmalige beschikbaarheid zijn veel van deze, maar niet alle, validatie studies uitgevoerd in vrouwelijke dieren (zie hieronder verschillende gepubliceerde studies met ofwel mannelijke ofwel vrouwelijke dieren waarin deze gevalideerde modellen zijn gebruikt). Door deze validaties, welke nog uitgevoerd zijn onder de oude WoD regelgeving, is een grote historische database ontstaan met data van verschillende influenza virussen in de verschillende geslachten. Indien voor toekomstige experimenten gekozen zou worden voor het gelijkwaardig gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal de volledige validatie van het model opnieuw uitgevoerd dienen te worden. Aangezien de spreiding van de resultaten bij gelijkwaardig gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren niet bekend is kan op voorhand geen uitspraak gedaan worden over de benodigde groepsgrootte van dergelijke experimenten.

Voorbeeld 1 (gebruik van mannelijke dieren):

Vaccine 29 (2011) 9265–9270



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



Efficacy of live attenuated vaccines against 2009 pandemic H1N1 influenza in ferrets

^a ViroClinics Biosciences B.V., Dr. Molewaterplein 50, 3015 GE, Rotterdam, The Netherlands

^b Department of Virology, Erasmus Medical Center, Dr. Molewaterplein 50, 3015 GE, Rotterdam, The Netherlands

^c Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlov Street, 197376 St Petersburg, Russia

^d Serum Institute of India Ltd, 212/2 Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar, Pune, Maharashtra 411028, India

^e Government Pharmaceutical Organization, 75/1 Rama VI Road, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand

^f World Health Organization, 20 Av Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland

2.2. Animals

Groups of six healthy outbred male ferrets (*Mustela putorius furo*), approximately 9 months of age and seronegative for antibodies against circulating influenza viruses B, A/H1N1, A/H3N2 and A/pH1N1 by hemagglutination inhibition (HI) assay were used. Two weeks prior to the start of the experiment, the animals were anesthetized using a cocktail of ketamine (Alfasan, Woerden, The Netherlands) and domitor (Orion Pharma, Espoo, Finland), and a temperature logger (DST micro-T ultra small temperature logger; Star-Oddi, Reykjavik, Iceland) was placed in their peritoneal cavity. This device recorded body temperature of the animals every 10 min. During the whole experiment the animals were maintained in negatively pressurized glovebox isolator cages, and provided with commercial food pellets and water *ad libitum*. The experimental protocol was approved before the start of the experiments by an independent institutional animal ethics committee according to Dutch law.

Voorbeeld 2 (gebruik van vrouwelijke dieren):

Vaccine 29 (2011) 2120–2126



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



Pandemic H1N1 vaccine requires the use of an adjuvant to protect against challenge in naïve ferrets

^a GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium

^b Viroclinics Biosciences BV, Rotterdam, The Netherlands

^c Department of Virology, Erasmus Medical Center (MC), Rotterdam, The Netherlands

2.2. Immunization with H1N1 A/California/07/2009 split vaccine

Eight groups of six ferrets received intramuscularly one (day 21) or two vaccinations (days 0 and 21) with different formulations. Groups 2, 4 and 6 received two vaccinations with 15, 3.75 or 1.9 μg HA of AS03_A-adjuvanted H1N1 A/California/7/09 split vaccine, respectively. Groups 3 and 5 received one vaccination with 3.75 or 1.9 μg HA of AS03_A-adjuvanted H1N1 A/California/7/09 split vaccine, respectively. Finally, group 7 received two vaccinations with 1.9 μg HA of AS03_B-adjuvanted H1N1 A/California/7/09 split vaccine. The control groups 1 and 8 received two vaccinations (3 weeks interval) with 15 μg HA of the non-adjuvanted H1N1 A/California/7/09 split vaccine and two vaccinations with PBS, respectively.

For each experiment, 48 outbred female ferrets, approximately 8 months old, weighing 0.5–0.9 kg and seronegative for Aleutian disease virus, currently circulating prototype and H1N1 A/The Netherlands/602/09 influenza viruses were used for this experiment.

Intranasal H5N1 Vaccines, Adjuvanted with Chitosan Derivatives, Protect Ferrets against Highly Pathogenic Influenza Intranasal and Intratracheal Challenge

1 Retroscreen Virology, London, United Kingdom, **2** Viroclinics Biosciences BV, Rotterdam, Netherlands, **3** Archimedes Development Limited, Nottingham, United Kingdom, **4** University of Siena, Siena, Italy, **5** VisMederi LifeSciences, srl, Siena, Italy, **6** Department of Viroscience, Erasmus MC, Rotterdam, Netherlands, **7** Evicom, Teddington, United Kingdom, **8** Department of Clinical Science, University of Bergen, Bergen, Norway, **9** Department of Research and Development, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway

Ferrets & Study Procedures

Thirty-six healthy outbred male ferrets approximately 12 months of age, between 1350 g and 2575 g in weight, were purchased from a commercial breeder. Animals were housed and experiments were conducted in compliance with EU directive 86/609/EEC and Dutch legislation (Experiments on Animals Act, 1997). The protocol was approved by the independent animal experimentation ethical review committee of the Netherlands Vaccine Institute (permit number 201100332). Additional information on animal husbandry can be found in the File S1.

All ferrets tested negative for the presence of HAI antibodies against the challenge virus and recent seasonal strains of Influenza and Aleutian disease virus.

Three days prior to the first immunisation, the animals had temperature transponders implanted into the peritoneal cavity (DST micro-T ultra-small temperature logger; Star-Oddi, Reykjavik, Iceland). This device recorded the body temperature of the animals every 10 minutes. Effect of virus infection on body temperature was assessed for changes in the temperature of each ferret post inoculation. Body weights were measured at 1 and 7 days before inoculation and on 1, 2, 3, 4 and 5 days post inoculation (dpi). Serum was taken days 0, 21, 42, and 49 for hemagglutination inhibition (HAI), virus neutralization (VN), and single radial haemolysis (SRH) serology assays. Nasal and throat swabs were taken on 1, 2, 3, 4 and 5 dpi.

Voorbeeld 4 (gebruik van vrouwelijke dieren):

Vaccine 29 (2011) 2092–2099



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



Longevity of the protective immune response induced after vaccination with one or two doses of AS03_A-adjuvanted split H5N1 vaccine in ferrets

^a GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium

^b ViroClinics Biosciences BV, Rotterdam, The Netherlands

^c Department of Virology, Erasmus Medical Center (MC), Rotterdam, The Netherlands

^d GlaxoSmithKline Biologicals, Dresden, Germany

2.1. Animals

Forty-eight outbred female ferrets (*Mustela putorius furo*, Schimmel Farms, Uddel, The Netherlands) were used in this study. The animals were approximately 8 months old, weighed 0.8–1.5 kg at the beginning of the experiment and were serologically tested for Aleutian disease virus by using counter-immunoelectrophoresis [16] and for the presence of antibodies against circulating seasonal influenza virus strains (A/H1N1, A/H3N2 and B) and the challenge virus (H5N1 strain A/Indonesia/5/2005) by using an influenza haemagglutination inhibition (HI) assay as described before [14].

Seronegative animals were transferred into the animal facility, identified by an electronic microchip (Plexx, Elst, The Netherlands) and physically inspected on regular time points during the study.

The animals were housed in normal cages during the vaccination phase or in glove box isolator cages from the day of challenge, using sawdust as bedding. The animal facility conditions were a standard day/night light cycle (12 h/12 h), a temperature of 21 ± 2 °C and a relative humidity of 40–60%. The animals had access to tap water and food (Hope Farms, Ferret super) *ad libitum*.

Voorbeeld 5 (gebruik van mannelijke dieren):

Prolonged Influenza Virus Shedding and Emergence of Antiviral Resistance in Immunocompromised Patients and Ferrets

1 Department of Virology, ErasmusMC, Rotterdam, The Netherlands, **2** Viroclinics Biosciences B.V., Rotterdam, The Netherlands, **3** Department of Paediatrics, ErasmusMC-Sophia, Rotterdam, The Netherlands, **4** Department of Neurology, ErasmusMC, Rotterdam, The Netherlands, **5** Department of Hospital Pharmacy, ErasmusMC, Rotterdam, The Netherlands

administered to antagonize the effect of medetomidine. All ferrets were eleven-month-old purpose-bred males (body weights between 1562 and 2362 g) and were seronegative for

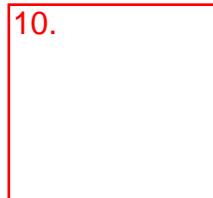
New Class of Monoclonal Antibodies against Severe Influenza: Prophylactic and Therapeutic Efficacy in Ferrets

1 Crucell Holland BV, Leiden, The Netherlands, 2 ViroClinics BV, Rotterdam, The Netherlands, 3 Department of Virology, ErasmusMC, Rotterdam, The Netherlands

Animal Studies

The study was performed with outbred ferrets (*Mustela putorius furo*, female, age approximately 8 months, Schimmel Farms, Uddel, the Netherlands). Ferrets were screened for the presence of serum antibodies against Aleutian Disease virus, circulating seasonal influenza virus strains (A/H1N1, A/H3N2 and B) and the challenge virus (H5N1, A/Indonesia/5/2005), and only seronegative animals were used in the study. The animals were housed in study groups of 6 (prophylactic experiment) or 10 (therapeutic experiment).

Antibodies were administered by intravenous injection in the jugular vein. Viral challenge was performed intratracheally with 10^5 TCID₅₀ A/Indonesia/05/2005 in 3 mL of PBS [33]. Clinical observations were performed twice a day on days of intervention and once daily on other days. In the prophylactic experiment, animals were weighed 2 weeks before viral challenge (day -14), immediately prior to antibody administration (day -1), and after challenge (days 2, 4, and 5 or on the day of premature death). In



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

██████████
Nistelrooise Baan 3

5347 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
AVD905002015161

Bijlagen

2

Datum 4 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 3 juli 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002015161. 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: 5347 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 2018
Titel project: Preclinical model development for HRSV in ferrets
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van een preklinisch model voor onderzoek naar en testen van behandelings- en beschermingsstrategiën tegen Humaan Respiratoir Syncytieel Virus (HRSV) in fretten
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (

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:

3 juli 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5347 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
AVD905002015161

Bijlagen

2

Datum 4 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 4 november 2015

Vervaldatum: 4 december 2015

Factuurnummer: 15700161

| Omschrijving | Bedrag |
|--|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015161 | € 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.

- Strekking van de vraag / vragen
- Strekking van het (de) antwoord(en)

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 23 juli 2015.
- Strekking: completering van de aanvraag; de vragen hadden betrekking op de volgende punten:
 - o Nadere toelichting en beargumentering van de achtergronden, doelstelling, en de haalbaarheid van het project.
 - o Nadere toelichting m.b.t de achterliggende ratio en argumentatie bij de verschillende experimenten.
 - o De inschatting van het ongerief m.n. voor de immuungecompromitteerde dieren die gechallenged worden, en in verband daarmee het formuleren van heldere en scherp gestelde HEP-criteria (in het licht van de doelstelling van het experiment).
 - o Bepalen van een window of opportunity met voldoende onderscheidend vermogen voor experiment 4, zonder dat er sprake is van extra ongerief voor de dieren.
 - o Redactionele aspecten: Nader verduidelijken danwel toespitsen van diverse tekstpassages en een logische en consequente opname van tekstpassages bij de desbetreffende (sub)hoofdstukken in elk formulier. Zorgvuldig en consequent afstemmen van de tekst van de het projectvoorstel en de verschillende bijlagen onderling. Omvang en helderheid van de tekst en het taalgebruik in de NTS.

- Datum antwoord: 13 oktober 2015
- Strekking van de antwoorden: In de lijn der verwachting; aanvraag na aanpassing 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 (adviesaanvraag):

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 doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Infectie met HRSV speelt wereldwijd een belangrijke rol bij ziekte en sterfte als gevolg van luchtweginfecties. Vooral bij jonge kinderen in ontwikkelingslanden is HRSV de belangrijkste oorzaak van ernstige infecties van de lagere luchtwegen. Andere risicogroepen zijn vroeggeboren kinderen en kinderen met aangeboren aandoeningen, ouderen en mensen met een verzwakt immuunsysteem. Ondanks voortdurende inspanningen is er tot nu toe nog geen goed werkzaam en veilig vaccin beschikbaar. Bij in het verleden ontwikkelde vaccins bleek de infectie bij gevaccineerden vaak ernstiger te verlopen dan bij niet gevaccineerden. Dergelijke paradoxale effecten moeten worden voorkomen. Met de tot dusverre beschikbare diermodellen is onderzoek naar dit aspect niet goed mogelijk. Een diermodel als de fret, dat overeenkomsten vertoont met mensen, met name wat betreft het klinische verloop en de symptomen van luchtweginfecties, kan daarbij uitkomst bieden. Evenmin is er een bewezen effectieve standaard behandeling voor mensen met een ernstige lagere luchtweginfectie a.g.v. HRSV. Uit recent onderzoek is gebleken dat de fret nieuwe en tot voorheen niet beschikbare mogelijkheden biedt voor het onderzoek naar HRSV in vivo. Met de experimenten in dit project wordt

beoogd het HRSV/frettenmodel verder te ontwikkelen als een preklinisch model voor HRSV. Met een dergelijk model kunnen interventiestrategieën voor specifieke doelgroepen worden getest die voorheen niet in andere diermodellen onderzocht konden worden. Hiermee kan een belangrijke bijdrage worden geleverd in het ontwikkelen van strategieën voor preventie en interventie in de toekomst.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Bij de onderzoeksgroep bestaat voldoende expertise en ervaring voor het uitvoeren van dit type onderzoek.
5. Er is geen sprake van de bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze voor de diersoort is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Fretten worden beschouwd als het meest geschikte preklinische diermodel vanwege de overeenkomsten met mensen wat betreft de luchtwegen, m.n. met betrekking tot de mogelijkheid tot overdracht van HRSV infectie en de klinische reactie op luchtweginfecties (zoals influenza, waar deze diersoort veel voor wordt gebruikt). Daarmee is de fret het meest geschikt om te onderzoeken of het vaccin bescherming biedt tegen de symptomen van een HRSV-infectie.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De dieren ondergaan matig ongerief als gevolg van het onderdrukken van het immuunsysteem voor een deel van de dieren, chirurgische implantatie van data loggers, sedatie voor afname van bloed en veegmonsters uit neus en keel, toediening van behandelingen en vanwege de symptomen na infectie met RSV. De dieren worden gedurende het gehele experiment en met name na infectie intensief gecontroleerd. Dieren die het humane eindpunt (meer dan matig ongerief) bereiken worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Het effect van therapieën en vaccins op de symptomen die optreden bij luchtweginfecties kan alleen effectief bestudeerd worden in een levend dier, met complete fysiologische reacties.

- 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. Op basis van de uitkomsten van de eerste studie voor wat betreft de optimale infectiedosis alsmede op basis van statistische berekeningen van de vereiste groepsgrootte in de verschillende experimenten, wordt voorkomen dat onnodig dieren worden gebruikt.
- 9.** Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De dieren worden in groepen gehuisvest. De dieren worden gesedeerd voor handelingen en ingrepen en euthanasie vinden plaats onder anesthesie. 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 in deel C (1 t/m 9) komt de commissie tot de volgende ethische afweging.

Het belang van het project is vooral gelegen in het feit dat er nog geen vaccin beschikbaar is voor de veel voorkomende HRSV-infectie, die met name voor de risicogroepen met ernstige ziekteverschijnselen en sterfte gepaard kan gaan. De ontwikkeling van een diermodel in fretten biedt nieuwe mogelijkheden voor onderzoek naar HRSV, omdat met dit model ook onderzocht kan worden in hoeverre preventie- en interventiestrategieën bescherming bieden tegen de ernstige symptomen van de ziekte. Dit is vooral van belang, omdat in het verleden de ervaring is opgedaan dat een HRSV vaccin paradoxale effecten kan hebben, waardoor de aandoening ernstiger verloopt dan bij niet-gevaccineerden. Het onderzoek is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor de mens. Naar het oordeel van de DEC dient het project een substantieel belang.

Tegenover dit belang staat het feit dat de dieren matig ongerief zullen ondervinden. De commissie is ervan 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, omdat het onderzoek zich richt op het ontwikkelen van een ziektemodel in fretten waarbij de symptomen van deze luchtweginfectie zoveel mogelijk overeenkomsten vertonen met die bij mensen. De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van de dieren.

De DEC is van oordeel dat het hierboven 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

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



13.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3
5347 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
AVD905002015161

15 DEC. 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ,

Op 3 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Preclinical model development for HRSV in ferrets" met aanvraagnummer AVD905002015161. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 2 december 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft gereageerd op de vraag van de CCD over het geslacht van de te gebruiken dieren. De commissie heeft kennis genomen van uw antwoord en stemt in met uw uitleg.

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 en hieronder gemotiveerd. U kunt met uw project "Preclinical model development for HRSV in ferrets" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 december 2015 tot en met 1 september 2018. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de datum in de aanvraag in het verleden ligt. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie  gevoegd. Dit advies is opgesteld op 19 oktober 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons grotendeels vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie grotendeels 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. De CCD stelt wel voorwaarden aan dit project. Een algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. Bovendien, in het kader van de 3 V's stelt de CCD een voorwaarde met betrekking tot go/no-go momenten.

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.

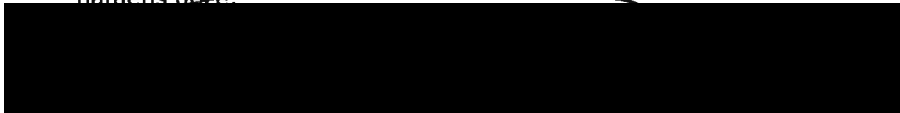
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<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).

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: 5347 RE SCHAIJK
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 december 2015 tot en met 1 september 2018, voor het project "Preclinical model development for HRSV in ferrets" met aanvraagnummer AVD905002015161, 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 3 november 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 3 november 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 3 november 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 19 oktober 2015, ontvangen op 3 november 2015.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 2 december 2015

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|--|---------------|------------------|-------------|
| Dose Finding, clinical signs and transmission of HRSV in ferrets | Fretten (<i>Mustela putorius furo</i>) / 6-12 months old; seronegative for HRSV and Aleutian disease | ■ | Matig / moderate | |
| Time Course of HRSV infection in Ferrets | Fretten (<i>Mustela putorius furo</i>) / Gelijk aan dierproef 1. | ■ | Matig / moderate | |
| Assessment of therapeutic treatment of HRSV infection in ferrets | Fretten (<i>Mustela putorius furo</i>) / Gelijk aan dierproef 1. | ■ | Matig / moderate | |
| Assessment of enhanced disease after vaccination with formalin-inactivated (FI) HRSV vaccines | Fretten (<i>Mustela putorius furo</i>) / Gelijk aan dierproef 1. | ■ | Matig / moderate | |

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.

| Inventaris Wob-verzoek W17-05 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|--|------|
| nr. | document NTS nr 2015183 | 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 | NTS | x | | | | | | | | |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven 1 | | | x | | | | | | |
| 5 | Bijlage beschrijving dierproeven 2 | | | x | | | | | | |
| 6 | DEC advies | | | | x | | x | x | | |
| 7 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | | |
| 8 | Verzoek om aanvullende informatie | | | | x | | x | x | | |
| 9 | Advies CCD aan bestuur | | x | | | | | | | x |
| 10 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |

10 DEC 2015

AUD905 DU2015 183



1.

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? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 90500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt. | <table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>BioXpert B.V.</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>54838134</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Nistelrooise Baan 3</td></tr><tr><td>Postbus</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>5374 RE Schaijk</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL72RABO0183605888</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>BioXpert BV</td></tr></table> | 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 | 5374 RE Schaijk | IBAN | NL72RABO0183605888 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | BioXpert BV |
| 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 | 5374 RE Schaijk | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IBAN | NL72RABO0183605888 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | BioXpert BV | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | <table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>BioXpert B.V.</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table> | (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. | Functie | [REDACTED] | | Afdeling | BioXpert B.V. | | Telefoonnummer | [REDACTED] | | E-mailadres | [REDACTED] | | |
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Functie | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Afdeling | BioXpert B.V. | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E-mailadres | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. | <table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>BioXpert B.V.</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table> | (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie | [REDACTED] | | Afdeling | BioXpert B.V. | | Telefoonnummer | [REDACTED] | | E-mailadres | [REDACTED] | | |
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Functie | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Afdeling | BioXpert 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 | 15 - 12 - 2015 |
| Einddatum | 15 - 12 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bepalen van de veiligheid van een nieuw vaccin tegen malaria
- 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 | 7 - 12 - 2015 |
| Handtekening | [REDACTED] |



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.

Meer dan een derde van de wereld populatie loopt het risico om malaria te krijgen. Elk jaar krijgen naar schatting 200 miljoen mensen malaria en sterven er meer dan een half miljoen mensen aan deze ernstige ziekte. Elke minuut sterft een kind aan de gevolgen van een malaria infectie. Naast sterfte en ziektelast heeft malaria een grote impact op de sociale en economische ontwikkeling van vooral ontwikkelingslanden. Malaria behoort derhalve tot de grootste mondiale infectieziekten.

Malaria wordt veroorzaakt door een parasiet genaamd *Plasmodium* en wordt vooral 's nachts overgebracht via beten van *Plasmodium*-geïnfecteerde muggen. Preventie is mogelijk door bescherming tegen deze muggenbeten door te slapen onder bednetten (klamboes) geïmpregneerd met een insecticide. Tevens zijn er geneesmiddelen waarmee malaria effectief kan worden behandeld. Betere inzet van deze bestaande middelen hebben de afgelopen jaren gezorgd voor een significante afname van malaria (met 30-50%) in vele gebieden maar deze trend dreigt te stagneren door resistentie van de parasiet tegen deze bestrijdingsstrategieën.

Malaria maakt nog steeds veel dodelijke slachtoffers in de grootste risico groep van vooral jonge Afrikaanse kinderen die nog geen natuurlijke afweer hebben kunnen opbouwen. Natuurlijke bescherming ontstaat namelijk pas na jaren van blootstelling en doorlopen infecties. Een werkzaam vaccin is dringend gewenst maar niet beschikbaar. Doelstelling van een vaccin is training van het afweer of wel immuun systeem opdat afdoende bescherming wordt bereikt bij een natuurlijke blootstelling aan infectie.

Beschikbaarheid van een beschermend vaccin heeft de hoogste prioriteit voor een succesvolle strijd tegen malaria. Waarschijnlijk later dit jaar wordt het eerste malaria vaccin met de naam RTS,S naar de markt gebracht na een ontwikkelingsfase van ruim twee decennia. Dit vaccin is gebaseerd op een eiwit van de parasietvorm die door muggen wordt overgebracht, de zogenaamde sporozoitien. Na RTS,S vaccinatie zijn jonge kinderen voor 30-50% beschermd gedurende een aantal maanden. Bemoedigend maar een effectiever vaccin is dringend nodig.

Een ander vaccinatiestrategie richt zich op de ontwikkeling van een sporozoitien (de asexuele parasietenvorm) vaccin, niet op basis van 1 eiwit (zoals bij RTS,S) maar door gebruik te maken van de hele sporozoitien. Deze methode is uitvoerig getest in het Controlled Human Malaria Infection Model (CHMI), waarbij vrijwilligers geïnfecteerd worden met sporozoitien middels beten van malaria muggen (*Nat. Rev Imm 2010*). Dit blijkt een effectieve en veilige methode om bescherming tegen malaria te ontwikkelen, maar een groot nadeel hiervan is dat de vrijwilligers dus worden blootgesteld aan de potentieel dodelijke malariaparasiet. Daarom worden de parasieten verzwakt of wordt een antimalariamiddel gegeven ter voorkoming van de ziekte. Deze methode naar het veld brengen is om praktische redenen moeilijk uitvoerbaar gezien de kans van een doorbraak infectie te groot is.

Wij willen daarom de veiligheid van een nieuw vaccin tegen malaria bestuderen. Dit vaccin is gebaseerd op het gebruik van genetisch gemodificeerde knaagdier parasieten (*P. berghei*) als dragers van de immunogene antigenen van de *Plasmodium* soort die de mens kan infecteren.

Meer specifiek: in deze studie zal de biodistributie en de toxiciteit /veiligheid van het experimentele vaccin bestaande uit genetisch gemodificeerde *P. berghei* parasieten die *P. falciparum* circumsporozoïte proteïne (CS) tot expressie brengt onder de controle van de *P. berghei* UIS4 promotor (Pb(PfCS@UIS4)), bepaald worden in konijnen.

De genetisch gemodificeerde knaagdier malaria parasiet (*Plasmodium berghei*) is niet pathogeen voor de mens, maar kan wel een afweer respons opwekken. Uit preklinische *in vitro*- en *in vivo* data blijkt de parasiet in staat te zijn om de humane levercel te infecteren, wat nodig is om zo een afweer respons op te wekken, zonder in staat te zijn de humane rode bloedcel te infecteren, wat normaal gesproken de klinische symptomen zou veroorzaken. De gevolgen voor de mens van de infectie van de humane levercel door *P. berghei* zijn onbekend, gezien *P. berghei* infecties nooit in mensen zijn beschreven. Niet gepubliceerde data

laten wel zien dat mensen die in het lab werken met *P. berghei* ooit gestoken zijn, zonder ziek te worden. In *P. falciparum* is de infectie van de humane levercel asymptomatisch en overeenkomstig is bij knaagdieren infectie met *P. berghei* ook asymptomatisch.

Door een eiwit (CS) van de humane *Plasmodium falciparum* (Pf) parasiet toe te voegen aan de knaagdierparasiet kan er een sterker specifiek afweer respons ontstaan tegen Pf. Deze methode zou een oplossing kunnen betekenen voor de ontwikkeling van een effectief beschermend malariavaccin te ontwikkelen, zonder de kans op doorbraakinfecties. Er is onlangs aangetoond dat er bescherming optreedt in muizen via passieve immunisaties met immuunsera van konijnen en muizen die geïmmuniseerd zijn met PbPfCS@UIS4-geïnfecteerde muggen. Deze pre-klinische efficacy studies ondersteunen de hypothese en de wetenschappelijke onderbouwing dat immunisaties met PbPfCS@UIS4 bescherming kan geven tegen malaria.

Er is in deze dierproef gekozen voor het konijn als diermodel omdat het konijn geen natuurlijke gastheer voor *P. berghei* is. De parasiet kan zich niet ontwikkelen in een konijnen erythrocyt, wat noodzakelijk is om ziekteverschijnselen te krijgen. De parasiet kan wel hepatocyten van konijnen invaderen en zich daar verder ontwikkelen wat nodig is voor het induceren van een (immuun)respons. Een konijn kan dus geen malaria ontwikkelen met het daarbij behorende ongerief, maar kan wel een (immuun)respons tegen de malariaparasieten opwekken.

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?

In dit project zal de biodistributie en de veiligheid van het vaccin bestaande uit genetisch gemodificeerde *P. berghei* parasieten die *P. falciparum* circumsporozoïte proteïne (CS) tot expressie brengt onder de controle van de *P. berghei* UIS4 promotor (Pb(PfCS@UIS4)), worden bepaald in konijnen.

Deze voorgestelde studie worden gedaan om informatie te verzamelen over de veiligheid en toxiciteit voor toekomstige Fase I/IIa klinische trials met dit experimentele vaccin.

De eventuele toxische effecten na herhaalde doseringen zullen worden bepaald omdat in een klinische setting meerdere immunisaties nodig zijn. De voorgestelde toedieningsroute en 'dosering'-schema komen overeen met diegene zoals gebruikt zullen worden in de kliniek. Hierbij wordt rekening gehouden met de mogelijke verschillen in de tijd voor het ontstaan van een reactie tussen dieren en mensen.

Door de richtlijn van de FDA te volgen wordt getracht een zo zorgvuldig mogelijke aanpak van het onderzoek te hebben. Door de zeer experimentele aard van deze methode en de lastig te voorspellen effecten van het vaccin, wordt er voor een zo breed mogelijk aanpak gekozen en wordt een zo hoogst mogelijke standaard gevolgd om de veiligheid te bepalen voor de humane studie. Er zouden minder bloedanalyses en ex vivo (pathologische) analyses gedaan worden wanneer de richtlijn van FDA niet gevolgd zou worden. Echter door dit nu mee te nemen en te includeren, is de "herhaling" van tenminste een deel van de voorgestelde experimenten niet nodig.

3.3 Belang

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

Medisch belang

Elk jaar sterven meer dan een half miljoen mensen aan de gevolgen van malaria. Ongeveer 200 miljoen mensen worden elk jaar blootgesteld aan de effecten van deze infectieziekte. Malaria is hiermee de

infectieziekte met de grootste ziektelast ter wereld. De hoge kosten en toenemende resistentie van oude en nieuwe anti-malariamiddelen maken een snelle implementatie van een goed werkend malariavaccin noodzakelijk. Deze studie zal bijdragen aan het vinden van een veilig en klinisch toepasbaar vaccin tegen malaria.

Wetenschappelijk belang

De ontwikkeling van een nieuw vaccin tegen malaria dat klinisch toepasbaar is. Deze studie zal bijdragen aan de preklinische studies die de veiligheid beoordelen van immunisaties met Pb(PfCS@UIS4), voordat deze in humane studies zullen worden getest.

Maatschappelijk belang

De ziektelast en het sterftcijfer van malaria zijn groot. De resistentie van de parasiet tegen de beschikbare anti-malariamiddelen neemt toe. Daarnaast zijn de kosten van deze medicijnen hoog. De ontwikkeling van een goedkoop en effectief vaccin tegen humane malaria is daarom erg belangrijk. Dit zal veel ziektelast besparen en vele levens redden.

Deze studie maakt onderdeel uit van een groot project, gesubsidieerd door de Bill & Melinda Gates Foundation en Path- Malaria Vaccine Initiative, dat door het Radboudumc zal worden uitgevoerd. De doelstelling van dat project is de ontwikkeling van een nieuw veilig en effectief vaccin tegen humane malaria. Deze toxicologie studie is gericht op het beoordelen van de veiligheid van immunisaties met Pb(PfCS@UIS4), voordat deze in humane trials getest zal worden.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Muggen met en zonder Pb(PfCS@UIS4) parasieten krijgen op verschillende dagen gedurende 15 minuten de gelegenheid het konijn (onder sedatie) te prikken. Hierdoor vindt er transmissie van de parasiet van de mug naar het konijn plaats. Deze wijze van transmissie komt overeen met de humane situatie waarbij de parasiet overgebracht wordt via muggenbeten naar mens. Er zal op nader te bepalen dagen nuchter bloed afgenomen worden om op basis van de veranderingen in leukocyten en serumeiwitten een eventueel toxisch effect te kunnen volgen.

Deze voorgestelde studie wordt gedaan om informatie te verzamelen over de veiligheid en toxiciteit voor toekomstige Fase I/IIa klinische trials met dit experimentele vaccin. De dagen van immunisatie zijn gebaseerd op de toekomstige klinische trial en FDA gerelateerde toxicologie studies (n+1), waarbij rekening gehouden is met een potentieel verschil tussen dier en mens. Het interval tussen immunisaties is zodanig dat er genoeg tijd is voor het opwekken van een immuunrespons. De tijdstippen van bloedafname zijn ook gebaseerd op de klinische trial. In het werkprotocol dat beoordeeld zal worden door de IvD, zullen de dagen waarop de konijnen geprikt worden en waarop bloed afgenomen wordt gespecificeerd en gemotiveerd worden.

Drie (acute fase) of achtentwintig dagen (herstel fase) na de laatste immunisatie zullen de dieren geëuthanaseerd worden waarna post-mortem de biodistributie van de Pb(PfCS@UIS4) parasieten bepaald zal worden.

Voorafgaand aan deze studie zal in een pilotstudie bepaald worden of de veiligheid van het vaccin in voldoende mate kan worden vast gesteld met het voorgestelde aantal muggen dat per konijn gebruikt zal worden (haalbaarheidsstudie).

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

De konijnen worden in het pilotexperiment 1- maal nuchter en onder sedatie blootgesteld aan 100 muggen

met wildtype *P. berghei* parasieten. Bepaald zal worden hoeveel van die 100 muggen daadwerkelijk het konijn gestoken heeft (feeding rate) en de parasiet heeft overgebracht.-Op basis van de feeding rate kan bepaald worden hoeveel muggen er gebruikt moeten worden in de eigenlijke studie om minimaal 75 muggenbeten per konijn te halen.

De konijnen worden in de eigenlijke proef 5- maal op nog nader te bepalen dagen nuchter en onder sedatie blootgesteld aan muggen met en zonder Pb(PfCS@UIS4) parasieten (minimaal aantal muggenprikken: 75). De dagen van blootstelling aan de muggen worden zo gekozen dat een immunologische respons kan optreden en dat een niet genetisch gemodificeerde parasiet normaal kan ontwikkelen. Op nog nader te bepalen dagen zal nuchter een bloed monsters afgenomen worden via de oorvene. De dieren moeten voor bloedafname of immunisatie nuchter zijn, omdat voeding labwaarden in het bloed kunnen doen veranderen. Daarnaast willen we voorkomen dat een konijn een volle maag heeft voordat het dier onder anesthesie gaat om te immuniseren. Er zal om de 14 dagen onder sedatie geïmmuniseerd worden en er zal maximaal 28-maal nuchter bloed afgenomen worden (max. 6.5 ml bloed per keer) met een interval variërend van 1-13 dagen. Per tijdstip wordt verschillende volumina bloed afgenomen in meerdere bloedbuizen met verschillende coagulantia voor verschillende assays of bepalingen, nl. chemie (sample volume 1,5 ml), hematologie (1,0 ml), hematologie (2,0 ml), coagulatie (2,0 ml), bepaling C-Reactive Protein and Serum Protein Electrophoresis (2,0 ml) en/of additionele fibrinogeen assay (2,0 ml). De aangegeven volumina per bepaling zijn de minimaal benodigde hoeveelheden voor de respectievelijke bepalingen. In het werkprotocol dat beoordeeld zal worden door de IvD, zal het aantal bloedafnames , de dagen waarop bloed afgenomen wordt en de hoeveelheid bloed per dag nader gespecificeerd en gemotiveerd worden. De dieren krijgen een afgemeten hoeveelheid voer in een gestandaardiseerd voerregime. Aan het begin van de werkdag (half negen of negen uur) zullen als eerste bloedmonsters afgenomen worden van nuchtere dieren waarna ze direct voer krijgen. Aan het einde van de werkdag wordt gecontroleerd of de voerbakken leeg zijn. Zo niet dan wordt het restant weggenomen (en eventueel gewogen). Het weghalen van het restant voer zal alleen plaatsvinden als de volgende dag bloed afgenomen wordt of geïmmuniseerd wordt.

Zie onderstaand schema voor een gedetailleerd tijdschema.

| week | Bloedafname op dag: | Volume (ml) | Totaal volume per week |
|------|--|-------------|------------------------|
| - 1 | Voor de start van de studie (nog nader te bepalen) | 6.5 | 6.5 |
| 1 | 0 | 6.5 | 17.5 |
| | 2 | 4.5 | |
| | 3 | 2.0 | |
| | 4 | 4.5 | |
| 2 | 8 | 4.0 | 4.0 |
| 3 | 14 | 4.5 | 15.5 |
| | 16 | 4.5 | |
| | 17 | 2.0 | |
| | 18 | 4.5 | |
| 4 | 22 | 2.0 | 2.0 |
| 5 | 28 | 4.5 | 15.5 |
| | 30 | 4.5 | |
| | 31 | 2.0 | |
| | 32 | 4.5 | |
| 6 | 36 | 2.0 | |

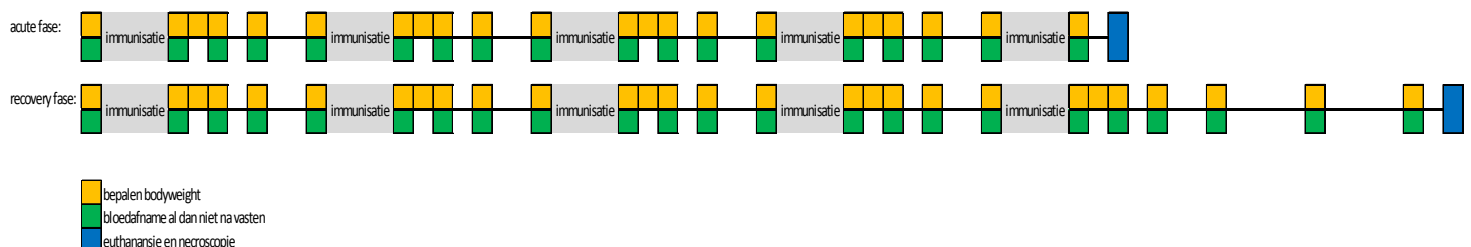
| | | | |
|----|-----------------|-----|------|
| 7 | 42 | 4.5 | 13.5 |
| | 44 | 4.5 | |
| | 46 | 4.5 | |
| 8 | | 0 | 0 |
| 9 | 56 | 4.5 | 17.5 |
| | 57 | 2.0 | |
| | 58 | 4.5 | |
| | 59 | 2.0 | |
| | 60 | 4.5 | |
| 10 | 64 | 2.0 | 2.0 |
| 11 | 70 | 4.5 | 6.5 |
| | 71 | 2.0 | |
| 12 | | 0 | 0 |
| 13 | 84 (euthanasie) | - | - |

In het werkprotocol dat beoordeeld zal worden door de IvD, zullen de dagen waarop de konijnen blootgesteld worden aan de muggen en waarop bloed afgenomen wordt gespecificeerd en gemotiveerd worden. Met dit aantal bloedafnames wordt onder de hoeveelheid van 17 ml per week gebleven, zoals staat in het artikel van Diehl et al. (J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001)). Ook zullen we de oogleden van de konijnen regelmatig monitoren op anemie. Indien anemie wordt vastgesteld wordt gedurende minimaal 1 week geen bloed afgenomen. Indien het dier dan nog niet voldoende hersteld is, zal het dier uit proef worden genomen.

Drie (acute fase) of achtentwintig (herstel fase) dagen na de laatste immunisatie zullen de dieren geëuthanaseerd worden waarna *ex-vivo* de biodistributie van de Pb(PfCS@UIS4) parasieten bepaald zal worden.

In het werkprotocol dat beoordeeld zal worden door de IvD, zullen de dagen waarop de konijnen blootgesteld worden aan de muggen en waarop bloed afgenomen wordt gespecificeerd en gemotiveerd worden.

Tijdlijn:



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.

In het pilotexperiment zal bepaald worden hoeveel muggen daadwerkelijk het konijn steken. Daartoe worden de muggen nadat ze gelegenheid hebben gehad om het konijn te prikken middels blootstelling aan ethanol gedood en de magen van de muggen gescoord op de aanwezigheid van bloed (feeding rate). Op basis van de feeding rate kan bepaald worden hoeveel muggen er gebruikt moeten worden in de eigenlijke studie om minimaal 75 muggenbeten per konijn te halen.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 1 | Pilotexperiment: Bepalen of de veiligheid van het vaccin in voldoende mate kan worden vast gesteld met het voorgestelde aantal muggen (haalbaarheidsstudie) |
| 2 | Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten |
| 3 | |
| 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. <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>Pilotexperiment: Bepalen of de veiligheid van het vaccin in voldoende mate kan worden vast gesteld met het voorgestelde aantal muggen (haalbaarheidsstudie)</td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 1 | Pilotexperiment: Bepalen of de veiligheid van het vaccin in voldoende mate kan worden vast gesteld met het voorgestelde aantal muggen (haalbaarheidsstudie) |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | | |
| 1 | Pilotexperiment: Bepalen of de veiligheid van het vaccin in voldoende mate kan worden vast gesteld met het voorgestelde aantal muggen (haalbaarheidsstudie) | | | | | |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In deze haalbaarheidsstudie worden konijnen nuchter en onder sedatie 1-maal geïnfecteerd met wildtype *P. berghei* parasieten via muggenbeten. Deze wijze van transmissie komt overeen met de humane situatie waarbij de parasiet overgebracht wordt via muggenbeten naar mens. Bepaald zal worden hoeveel van de muggen daadwerkelijk het konijn gestoken heeft (feeding rate) en de parasiet heeft overgebracht. Op basis van de feeding rate kan bepaald worden hoeveel muggen er gebruikt moeten worden in de eigenlijke studie om minimaal 75 muggenbeten per konijn te halen.

Hoewel niet het primaire doel, zal ook de mate van roodheid, oedeemvorming en jeuk op de plaats van de muggenbeten d.m.v. foto's in kaart gebracht worden. Dit om het scoren van deze paramaters door onze biotechnici te vergemakkelijken en te standaardiseren.

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.

De konijnen worden eerst geschoren op de plek van toediening (i.e. flank). Honderd muggen met wildtype *P. berghei* parasieten krijgen 1-maal 15 minuten de gelegenheid het konijn (dat gesedeerd en nuchter is) te prikken. De muggen zitten in een container en deze container wordt op de flank van het konijn geplaatst. Via de semipermeabele deksel (doorsnede 9 cm) kunnen de muggen het konijn prikken. Hierdoor vindt er transmissie van de parasiet van de mug naar het konijn plaats. Deze wijze van transmissie komt overeen met de humane situatie waarbij de parasiet overgebracht wordt via muggenbeten op de mens. Na 15 minuten

wordt de container van de flank gehaald en zullen de muggen gedood worden d.m.v. ethanol. Bepaald zal worden hoeveel muggen bloed in hun maag hebben (feeding rate). Op basis van de feeding rate kan bepaald worden hoeveel muggen er gebruikt moeten worden in de eigenlijke studie om minimaal 75 muggenbeten per konijn te halen.

De dieren krijgen een afgemeten hoeveelheid voer in een gestandaardiseerd voerregime. Aan het begin van de werkdag (half negen of negen uur) zullen nuchtere dieren blootgesteld worden aan de muggen waarna ze direct voer krijgen.

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

Voor deze haalbaarheidsstudie is geen powerberekening is uitgevoerd. Op grond van richtsnoeren van de registratie autoriteit (FDA) en op basis van ervaring en conventie zullen we 5 konijnen gebruiken.

B. De dieren

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

Wij stellen voor deze studie in konijnen te doen. Een konijn is geen natuurlijke gastheer voor *P. berghei*. Preklinische data laten zien dat de parasiet zich niet kan ontwikkelen in een konijnen erythrocyt, wat noodzakelijk is om ziekteverschijnselen te krijgen. Verder is gebleken dat *P. berghei* hepatocyten van konijnen kan invaderen en daar verder kan ontwikkelen wat nodig is voor het induceren van een (immuun)respons. We verwachten dus geen verspreiding van parasieten naar andere organen, maar wel een immuunrespons en de productie van antistoffen. Omdat de mens en het konijn in dit opzicht vergelijkbare reacties laten zien op de parasiet, zijn konijnen een goed alternatief voor humane preklinische toxicologie studies.

In deze studie zullen 5 mannelijke of vrouwelijke New Zealand White (surplus) konijnen gebruikt worden, afhankelijk van de beschikbaarheid bij de proefdierleverancier / fokker.

Herkomst: geregistreerde fokker in de EU

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

Het aantal van 100 muggen is gebaseerd op het aantal sporozoieten dat geïnjecteerd wordt na een muggenbeet. Het doel is om in het eigenlijke experiment alsook de humane klinische trial met minimaal 75 geïnfecteerde muggenbeten te immuniseren. In de praktijk zijn niet alle muggen geïnfecteerd (dit wordt vooraf bepaald als de infectie ratio) en zullen niet alle muggen bijten (feeding ratio), met gevolg dat waarschijnlijk meer muggen gebruikt moeten worden. Het gebruik van 100 muggen in deze pilot studie is zo vastgesteld om voor de eigenlijke studie aan de hand van de gevonden feeding ratio het aantal benodigde muggen te bepalen. Als bijv. 80% van de muggen zullen bijten, en de infectie ratio 90% is, dan zullen er voor de eigenlijke studie dus $75/0.9/0.8 = 105$ muggen gebruikt worden om er zeker van te zijn dat minimaal 75 geïnfecteerde muggen hebben gebeten.

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 welk

keuzes daarbij zijn gemaakt.

Verfijning:

Er is in deze dierproef gekozen voor het konijn als diermodel omdat het konijn geen natuurlijke gastheer voor *P. berghei* is. De parasiet kan zich niet ontwikkelen in een konijnen erythrocyt, wat noodzakelijk is om ziekteverschijnselen te krijgen. De parasiet kan wel hepatocyten van konijnen invaderen en zich daar verder ontwikkelen wat nodig is voor het induceren van een (immuun)respons. Een konijn kan dus geen malaria ontwikkelen met het daarbij behorende ongerief, maar kan wel een (immuun)respons tegen de malariaparasieten opwekken.

Vermindering:

De groepsgrootte is gebaseerd op grond van richtsnoeren van de registratie autoriteit (FDA) en op basis van ervaring en conventie. Er wordt geen uitval verwacht.

Vervanging:

In deze dierstudie wordt bepaald hoeveel muggen daadwerkelijk het konijn steken (feeding rate). Op basis van de feeding rate kan bepaald worden hoeveel muggen er gebruikt moeten worden in de eigenlijke studie om minimaal 75 muggenbeten per konijn te halen. Omdat dit pilotexperiment informatie genereert dat nodig is voor de eigenlijke studie kan het niet in een ander diermodel gedaan worden.

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.

De dieren zullen individueel gehuisvest worden met kooiverrijking. Bij groepshuisvesting is de kans op gebroken ruggen en ander verwondingen groter a.g.v. het 'blind' en wild door de ren heen rennen en is derhalve individuele huisvesting minder stressvol voor het dier.

De algemene gezondheid van de dieren zal dagelijks gecontroleerd worden.

De biotechnische handelingen zullen uitgevoerd worden volgens de geldende best practices en door gekwalificeerde en competente biotechnici.

De konijnen zullen eerst gesedeerd worden voordat ze blootgesteld zullen worden aan de muggen.

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.

De dieren zullen individueel gehuisvest worden met kooiverrijking. Bij groepshuisvesting is de kans op gebroken ruggen en ander verwondingen groter a.g.v. het 'blind' en wild door de ren heen rennen en is derhalve individuele huisvesting minder stressvol voor het dier. De dieren zijn bij de leverancier ook al individueel gehuisvest. Sociale huisvesting geeft dan zeer veel onrust en risico op ernstige verwondingen bij het uitvangen van de dieren.

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.

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?

Mogelijke roodheid, oedeemvorming om en jeuk op de plaats van de muggenbeten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Deze verschijnselen worden veroorzaakt door de (immuun)respons op de muggenbeten en de parasieten. Het aantal muggen per immunisatie is gebaseerd op het aantal sporozoieten dat geïnjecteerd wordt na een muggenbeet. Het doel is om in het eigenlijke experiment alsook in de geplande humane klinische trial met 75 geïnfecteerde muggenbeten te immuniseren. Er bestaat geen bewezen effectief uitwendig middel tegen jeuk anders dan medicatie met systemische effecten. Uitwendige toepassing van antihistaminica is niet aangewezen tegen jeuk. De Commissie Farmacotherapeutisch Kompas, van zorginstituut Nederland, adviseert op farmacotherapeutische gronden toedieningsvormen voor lokaal gebruik van tripelennamine (antihistaminicum) niet voor te schrijven. Muggenbeten zijn niet geassocieerd met pijn behalve minimale sensaties op het moment van de beten zelf. (De dieren zullen gesedeerd worden ten tijde van de muggenbeten.) Het lijkt zeer onwaarschijnlijk dat de dieren een ander ongerief dan jeuk zullen ondervinden door de muggenbeten.

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

De hierboven beschreven verschijnselen zijn inherent aan deze haalbaarheidsstudie. De algemene gezondheid van de dieren zal dagelijks gecontroleerd worden. Indien daartoe aanleiding, zal de IvD en/of een dierenarts geconsulteerd worden. Er zijn strikte criteria opgesteld welke moeten borgen dat een dier zo min mogelijk lijdt.

Elke klinische conditie dat euthanasie vereist om verder lijden te voorkomen:

- ernstige pilo-erectie (score 2)
- verlies van lichaamsgewicht (> 20%)
- een totale score van > 4 volgens de tabel

| Clinical sign | Score |
|------------------------------|------------------------------|
| Posture | 0 normal |
| | 1 Hunched back |
| Fur | 0 No, no pilo erection |
| | 1 Yes, slight pilo-erection |
| | 2 Yes, severe pilo-erection* |
| Level of locomotion activity | 0 Normal activity |
| | 1 Increased activity |
| | 2 Decreased activity |
| | 3 Withdrawal reflection |
| Skin color | 0 Normal pink |
| | 1 Pale |
| | 2 Dark red |
| Dermal Draize test | 0 Score 04 < 4 dagen |
| | 1 Score 04 > 4 dagen |
| Other | 0 |

* toepassen humane eindpunt

Er is besloten om de jeuk en een muggenbult op de plaats van de muggenbeten niet met bijv. Azaron te bestrijden omdat alle middelen die de konijnen zouden krijgen, kunnen interfereren met deze studie. Antihistaminica of corticosteroiden (middelen die goed werken tegen jeuk) kunnen een te groot systemisch effect geven. Daarnaast is het onlangs aangetoond dat histamine een effect heeft op de hoeveelheid parasieten in de lever na een malaria infectie in muizen, waardoor in dit geval antihistaminica liever niet worden gegeven.

De dieren zullen na te zijn blootgesteld aan de muggen op dezelfde dag intensief zullen worden geobserveerd om te zien of ze (overmatig) krabben en zichzelf daardoor verwonden. Mocht dit inderdaad het geval zijn, zal met de IvD besproken of en zo ja welk antijeukmiddel toe te passen.

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.

- ernstige pilo-erectie (score 2 volgens de tabel bij vraag I);
- verlies van lichaamsgewicht (> 20%)
- een totale score van > 4 volgens de tabel bij vraag I

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

0%

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.

Licht

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.

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. <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>2</td><td>Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten</td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 2 | Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | | |
| 2 | Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten | | | | | |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In deze studie worden konijnen (onder sedatie) 5-maal geïnfecteerd met al dan niet genetisch gemodificeerde parasieten via muggenbeten. Deze wijze van transmissie komt overeen met de humane situatie waarbij de parasiet overgebracht wordt via muggenbeten naar mens. Er zullen op nader te bepalen dagen maximaal 28-maal bloed afgenomen worden (max. 6.5 ml bloed per keer) met een interval variërend van 1-13 dagen om op basis van de veranderingen in leukocyten en serumeiwitten te volgen of het vaccin schadelijke effecten heeft. De dagen van immunisatie zijn gebaseerd op de toekomstige klinische trial en FDA gerelateerde toxicologie studies (n+1), waarbij rekening gehouden is met een potentieel verschil tussen dier en mens. Het interval tussen immunisaties (14 dagen) is zodanig dat er genoeg tijd is voor het opwekken van een immuunrespons. De tijdstippen van bloedafname zijn ook gebaseerd op de klinische trial. In het werkprotocol dat beoordeeld zal worden door de IvD, zullen de dagen waarop de konijnen geprikt worden en waarop bloed afgenomen wordt gespecificeerd en gemotiveerd worden.

Drie (acute fase) of achtentwintig (herstel fase) dagen na de laatste immunisatie zullen de dieren geëuthanaseerd worden waarna *ex-vivo* de biodistributie van de Pb(PfCS@UIS4) parasieten bepaald zal worden.

Tijdens de in-vivo fase van de proef zullen de volgende parameters bepaald worden:

- mortaliteit, morbiditeit, algemene gezondheid, tekenen van toxiciteit;
- lichaamsgewicht;

- voedsel inname;
- lichaamstemperatuur;
- roodheid, oedeemvorming en jeuk op de plaats van de muggenbeten;
- klinische observaties: afwijkingen aan de huid, ogen en slijmvliezen, respiratoire en circulatoire afwijkingen, afwijkingen van het centrale en autonome zenuwstelsel, motorische en gedragsafwijkingen;
- oftalmologisch onderzoek;
- serum: eiwitsamenstelling, hematologie, coagulatie, gehalte aan fibrinogeen en C-reactive Protein, parameters voor leverfunctie

De registratie-autoriteit de FDA stelt oftalmologisch onderzoek als een standaard onderdeel in toxicologische / veiligheidstudies zoals deze. Bij het oftalmologisch onderzoek zal met een oogspiegel (fundoscoop of oftalmoscoop) in het oog worden gekeken. Voorafgaand aan het oftalmologisch onderzoek worden atropine bevattende oogdruppels (1 per oog) gebruikt die zijn geregistreerd voor toepassing in hond en kat. Op grond van de gegevens van dat product worden geen systemische effecten verwacht. Er zal gekeken worden naar bijv. eventuele bloedingen of infarcten, naar retinopathie ('retinal whitening' (macula/perifeer), 'vessel changes' (tramlining/capillary whitening), 'retinal hemorrhages (white centered), papiloedeem, 'cotton wool spots'). Stapeling van de parasiet in het oog zal zeer onwaarschijnlijk zijn in deze studie. Het oftalmologisch onderzoek zal 2-maal plaats vinden, nl. voorafgaand aan de 1e immunisatie (pretest) en voorafgaand aan de necropsie.

Tijdens de *ex-vivo* / post-mortem fase van de proef zullen de volgende parameters bepaald worden:

- macroscopisch onderzoek van o.a. de huid, mond en anus, de toedieningsplaatsen, de craniale, thoracale en abdominale holtes en hun inhoud;
- hematologische analyse van het beenmerg uit het sternum;
- orgaangewichten;
- leverfunctie
- histopathologische analyse van geselecteerde organen en/of lesies.

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.

De konijnen worden eerst geschoren op de plek van toediening (i.e. flank). Pb(PfCS@UIS4) parasieten of controle parasieten zullen d.m.v. muggen op 5 nog nader te bepalen dagen toegediend worden. Muggen met en zonder Pb(PfCS@UIS4) parasieten krijgen op deze dagen 15 minuten de gelegenheid het konijn (nuchter en gesedeerd) te prikken. De muggen zitten in containers en deze containers worden steeds op de zelfde plaats op de flank van het konijn geplaatst. Via de semipermeabele deksel (doorsnede 9 cm) kunnen de muggen het konijn prikken. Hierdoor vindt er transmissie van de parasiet van de mug naar het konijn plaats. Deze wijze van transmissie komt overeen met de humane situatie waarbij de parasiet overgebracht wordt via muggenbeten op de mens. Per immunisatie moeten minimaal 75 muggen prikken. Drie (acute fase) of achtentwintig (herstel fase) dagen na de laatste immunisatie zullen de dieren geëuthanaseerd worden.

De 'dosering' van het vaccin (i.e. minimaal 75 muggenbeten) in het konijn komt overeen met tenminste de hoogste dosis welke gebruikt zal worden in de klinische trials. Het aantal muggen per immunisatie is gebaseerd op het aantal sporozoieten dat geïnjecteerd wordt na een muggenbeet. Het doel is om met 75 geïnfecteerde muggenbeten te immuniseren, zoals ook voorzien is voor de humane studie. In de praktijk zijn niet alle muggen geïnfecteerd (dit wordt vooraf bepaald als de infectie ratio) en zullen niet alle muggen bijten (feeding ratio), met gevolg dat waarschijnlijk meer muggen gebruikt moeten worden. Aan de hand van de feeding ratio zoals bepaald in het pilotexperiment zal het aantal benodigde muggen berekend worden. Als bijv. 80% van de muggen zullen bijten, en de infectie ratio 90% is, dan zullen er voor de eigenlijke studie dus $75/0.9/0.8 = 105$ muggen gebruikt worden om er zeker van te zijn dat minimaal 75 geïnfecteerde muggen hebben gebeten.

In het experiment wordt er 5-maal geïmmuniseerd. Dit is één immunisatie (n+1) meer dan in de geplande

humane studie. N+1 wordt als veiligheidsmarge genomen, wat gebruikelijk is voor toxicologische/veiligheidsstudies. Het immunisatieschema is afgeleid van het klinische regime waarbij het maandelijkse schema zoals in de klinische trials vervangen is door een tweewekelijks regime in het konijn. De tijd tussen immunisaties dient om een immuunrespons te induceren.

Er zal om de 14 dagen nuchter en onder sedatie geïmmuniseerd worden. Er zal maximaal 28-maal nuchter bloed afgenomen worden (max. 6.5 ml bloed per keer) met een interval variërend van 1-13 dagen). Per tijdstip wordt verschillende volumina bloed afgenomen in meerdere bloedbuizen met verschillende coagulantia voor verschillende assays of bepalingen, nl. chemie (sample volume 1,5 ml), hematologie (1,0 ml), hematologie (2,0 ml), coagulatie (2,0 ml), bepaling C-Reactive Protein and Serum Protein Electrophoresis (2,0 ml) en/of additionele fibrinogeen assay (2,0 ml). De aangegeven volumina per bepaling zijn de minimaal benodigde hoeveelheden voor de respectievelijke bepalingen. In het werkprotocol dat beoordeeld zal worden door de IvD, zal het aantal bloedafnames, de dagen waarop bloed afgenomen wordt en de hoeveelheid bloed per dag nader gespecificeerd en gemotiveerd worden. Zie onderstaand schema voor een gedetailleerd tijdschema.

| week | Bloedafname op dag: | Volume (ml) | Totaal volume per week |
|------|--|-------------|------------------------|
| - 1 | Voor de start van de studie (nog nader te bepalen) | 6.5 | 6.5 |
| 1 | 0 | 6.5 | 17.5 |
| | 2 | 4.5 | |
| | 3 | 2.0 | |
| | 4 | 4.5 | |
| 2 | 8 | 4.0 | 4.0 |
| 3 | 14 | 4.5 | 15.5 |
| | 16 | 4.5 | |
| | 17 | 2.0 | |
| | 18 | 4.5 | |
| 4 | 22 | 2.0 | 2.0 |
| 5 | 28 | 4.5 | 15.5 |
| | 30 | 4.5 | |
| | 31 | 2.0 | |
| | 32 | 4.5 | |
| 6 | 36 | 2.0 | |
| 7 | 42 | 4.5 | 13.5 |
| | 44 | 4.5 | |
| | 46 | 4.5 | |
| 8 | | 0 | 0 |
| 9 | 56 | 4.5 | 17.5 |
| | 57 | 2.0 | |
| | 58 | 4.5 | |
| | 59 | 2.0 | |
| | 60 | 4.5 | |
| 10 | 64 | 2.0 | 2.0 |
| 11 | 70 | 4.5 | 6.5 |
| | 71 | 2.0 | |
| 12 | | 0 | 0 |
| 13 | 84 (euthanasie) | - | - |

In het werkprotocol dat beoordeeld zal worden door de IvD, zullen de dagen waarop de konijnen blootgesteld worden aan de muggen en waarop bloed afgenomen wordt gespecificeerd en gemotiveerd worden. Met dit aantal bloedafnames wordt onder de hoeveelheid van 17 ml per week gebleven, zoals staat in het artikel van Diehl et al. (J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001)). Ook zullen de oogleden van de konijnen regelmatig monitoren op anemie. Indien anemie wordt vastgesteld wordt gedurende minimaal 1 week geen bloed afgenomen. Indien het dier dan nog niet voldoende hersteld is, zal het dier uit proef worden genomen.

De dieren krijgen een afgemeten hoeveelheid voer in een gestandaardiseerd voerregime. Aan het begin van de werkdag (half negen of negen uur) als eerste bloedmonsters afgenomen zullen worden van nuchtere dieren waarna ze direct voer krijgen. Aan het einde van de werkdag wordt gecontroleerd of de voerbakken leeg zijn. Zo niet dan wordt het restant weggenomen (en eventueel gewogen). Het weghalen van het restant voer zal alleen plaatsvinden als de volgende dag bloed afgenomen wordt of geïmmuniseerd wordt.

De konijnen zullen wekelijks gewogen worden in het kader van welzijnsbewaking.

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

Deze toxicologische studie is een observationele studie, waarvoor geen powerberekening is uitgevoerd. Op grond van richtsnoeren van de registratie autoriteit (FDA) en op basis van ervaring en conventie zullen we n=5 per groep gebruiken.

B. De dieren

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

Wij stellen voor deze studie in konijnen te doen. Een konijn is geen natuurlijke gastheer voor *P. berghei*. Preklinische data laten zien dat de parasiet zich niet kan ontwikkelen in een konijnen erythrocyt, wat noodzakelijk is om ziekteverschijnselen te krijgen. Verder is gebleken dat *P. berghei* hepatocyten van konijnen kan invaderen en daar verder kan ontwikkelen wat nodig is voor het induceren van een (immuun)respons. We verwachten dus geen verspreiding van parasieten naar andere organen, maar wel een immuunrespons en de productie van antistoffen. Omdat de mens en het konijn in dit opzicht vergelijkbare reacties laten zien op de parasiet, zijn konijnen een goed alternatief voor humane preklinische toxicologie studies.

In deze studie zullen 20 vrouwelijke en 20 mannelijke New Zealand White konijnen gebruikt worden. De keuze om zowel vrouwelijke als mannelijke konijnen te gebruiken voor deze studie is gebaseerd op de te onderzoeken veiligheidsaspecten die belangrijk zijn voor de humane studie. *Plasmodium berghei* is een parasiet die zich in verschillende soorten weefsels kan ontwikkelen. Het is nog niet eerder onderzocht of deze parasiet (en dus ook de transgene Pb(PfCS@UIS4) zich in geslachtsorganen zou kunnen ontwikkelen. Er wordt op deze manier uitgesloten dat de parasiet zich in geslachtsorganen van de (niet-natuurlijke) host zal ontwikkelen. De mogelijke hormonale verschillen tussen beide geslachten zouden potentieel een invloed kunnen hebben op de ontwikkeling van de parasiet. Ondanks dat er in de literatuur geen aanwijzingen zijn gevonden van hormonale invloeden op de ontwikkeling van de parasiet, is het belangrijk om dit voor de nieuw ontwikkelde transgene parasieten (Pb(PfCS@UIS4) uit te sluiten. Bij de humane studie zullen ook zowel mannen als vrouwen worden blootgesteld. Daarom wordt het noodzakelijk geacht om beide geslachten in de toxicologie studie te onderzoeken.

De dieren zullen verdeeld worden over een niet-geïnficeerde en geïnficeerde groep, waarbij 5 vrouwelijke en 5 mannelijke dieren per groep 3 dagen na de laatste immunisatie zullen worden geëuthanaseerd (acute fase; groep 1 t/m 4) en 5 vrouwelijke en 5 mannelijke dieren per groep 28 dagen na de laatste immunisatie (herstel fase; groep 5 t/m 8).

Herkomst: geregistreerde fokker in de EU

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

| Behandeling | Aantal dieren | | | |
|-------------------------------------|-------------------------|---------------|---------------------------|--------------|
| | Acute Fase ^a | | Herstel Fase ^b | |
| | Man | Vrouw | Man | Vrouw |
| Niet-geïnfecteerde muggen (control) | Groep 1: n=5 | Groep 2 : n=5 | Groep 5: n=5 | Groep 6: n=5 |
| Geïnfecteerde muggen | Groep 3: n=5 | Groep 4: n=5 | Groep 7: n=5 | Groep 8: n=5 |

a - Dieren worden 3 dagen na de 5^e immunisatie geëuthanaseerd

b - Dieren worden 28 dagen na de 5^e immunisatie geëuthanaseerd

Het aantal muggen per immunisatie is gebaseerd op het aantal sporozoieten dat geïnjecteerd wordt na een muggenbeet. Het doel is om met 75 geïnfecteerde muggenbeten te immuniseren, zoals ook voorzien is voor de humane studie. In de praktijk zijn niet alle muggen geïnfecteerd (dit wordt vooraf bepaald als de infectie ratio) en zullen niet alle muggen bijten (feeding ratio), met gevolg dat waarschijnlijk meer muggen gebruikt moeten worden. Aan de hand van de feeding ratio zoals bepaald in het pilotexperiment zal het aantal benodigde muggen berekend worden. Als bijv. 80% van de muggen zullen bijten, en de infectie ratio 90% is, dan zullen er voor de eigenlijke studie dus $75/0.9/0.8 = 105$ muggen gebruikt worden om er zeker van te zijn dat minimaal 75 geïnfecteerde muggen hebben gebeten.

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.

Verfijning:

Er is in deze dierproef gekozen voor het konijn als diermodel omdat het konijn geen natuurlijke gastheer voor *P. berghei* is. De parasiet kan zich niet ontwikkelen in een konijn erythrocyt, wat noodzakelijk is om ziekteverschijnselen te krijgen. De parasiet kan wel hepatocyten van konijnen invaderen en zich daar verder ontwikkelen wat nodig is voor het induceren van een (immuun)respons. Een konijn kan dus geen malaria ontwikkelen met het daarbij behorende ongerief, maar kan wel een (immuun)respons tegen de malariaparasieten opwekken.

Vermindering:

De groepsgrootte is gebaseerd op grond van richtsnoeren van de registratie autoriteit (FDA) en op basis van ervaring en conventie.. Er wordt geen uitval verwacht.

Vervanging:

Deze dierstudie is de laatste noodzakelijke studie voordat het experimentele vaccin in de mens getest kan worden. Helaas kan de voorgestelde veiligheidsstudie niet in proefpersonen gedaan worden. Er is gekozen voor een diermodel waarin dezelfde reacties waargenomen wordt als in de mens. Lagere diersoorten laten deze reacties niet (volledig) zien en zijn derhalve minder goed te gebruiken voor deze veiligheidsstudie.

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.

De dieren zullen individueel gehuisvest worden met kooiverrijking. Dit om de ernst van de zwelling, roodheid en oedeemvorming goed te kunnen volgen alsook dieren beter in de gaten te kunnen houden wat betreft voedsel- en waterinname en urineproductie. Daarnaast is bij groepshuisvesting de kans op gebroken ruggen en ander verwondingen groter a.g.v. het 'blind' en wild door de ren heen rennen en is derhalve individuele huisvesting minder stressvol voor het dier.

De algemene gezondheid van de dieren zal dagelijks gecontroleerd worden.

De biotechnische handelingen zullen uitgevoerd worden volgens de geldende best practices en door gekwalificeerde en competente biotechnici.

De gevolgen voor het dier van de infectie van de lever is een uitkomstmaat die we in deze studie juist willen bekijken om de veiligheid te kunnen beoordelen. Eerdere infecties met Pb(PfCS@UIS4) in konijnen bij de pre-klinische studies voor effectiviteit, lieten geen symptomen zien. Toen is echter leverfunctie niet meegenomen, gezien het geen veiligheid als endpoint had.

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.

De dieren zullen individueel gehuisvest worden met kooiverrijking. Dit om de ernst van de zwelling, roodheid en oedeemvorming goed te kunnen volgen alsook dieren beter in de gaten te kunnen houden wat betreft voedsel- en waterinname en urineproductie. Daarnaast is bij groepshuisvesting de kans op gebroken ruggen en ander verwondingen groter a.g.v. het 'blind' en wild door de ren heen rennen en is derhalve individuele huisvesting minder stressvol voor het dier. De dieren zijn bij de leverancier ook al individueel gehuisvest. Sociale huisvesting geeft dan zeer veel onrust en risico op ernstige verwondingen bij het uitvangen van de dieren.

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.

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?

Mogelijke roodheid, oedeemvorming om en jeuk op de plaats van de muggenbeten.

Mogelijke lichte korstvorming en op de oren

Mogelijke anemie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Roodheid, oedeemvorming om en jeuk worden veroorzaakt door de (immuun)respons op de muggenbeten en mogelijk de genetisch gemodificeerde parasieten. Het aantal muggen per immunisatie is gebaseerd op het aantal sporozoieten dat geïnjecteerd wordt na een muggenbeet. Het doel is om in het eigenlijke experiment alsook in de geplande humane klinische trial met 75 geïnfecteerde muggenbeten te immuniseren. Er bestaat geen bewezen effectief uitwendig middel tegen jeuk anders dan medicatie met systemische effecten.

Uitwendige toepassing van antihistaminica is niet aangewezen tegen jeuk. De Commissie

Farmacotherapeutisch Kompas, van zorginstituut Nederland, adviseert op farmacotherapeutische gronden toedieningsvormen voor lokaal gebruik van tripelennamine (antihistaminicum) niet voor te schrijven.

Muggenbeten zijn niet geassocieerd met pijn behalve minimale sensaties op het moment van de beten zelf.

(De dieren zullen gesedeerd worden ten tijde van de muggenbeten.) Het lijkt zeer onwaarschijnlijk dat de dieren een ander ongerief dan jeuk zullen ondervinden door de muggenbeten.

Mogelijke lichte korstvorming op de oren of mogelijke anemie kunnen optreden als gevolg van het herhaaldelijk bloed afnemen via de oorvene. Om in deze veiligheidsstudie het optreden van nadelige effecten van het vaccin goed te kunnen monitoren is het noodzakelijk om op regelmatige momenten na toedienen van het vaccin de verschillende parameters in het bloed te meten. Deze zelfde parameters zullen in de human klinische trial op dezelfde tijdstippen bepaald worden.

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

De hierboven beschreven verschijnselen zijn inherent aan deze veiligheidsstudie. De algemene gezondheid van de dieren zal dagelijks gecontroleerd worden. Indien daartoe aanleiding, zal de IvD en/of een dierenarts geconsulteerd worden. Er zijn strikte criteria opgesteld welke moeten borgen dat een dier zo min mogelijk lijdt.

Elke klinische conditie dat euthanasie vereist om verder lijden te voorkomen:

- ernstige pilo-erectie (score 2);
- verlies van lichaamsgewicht (> 20%)

- een totale score van > 4 volgens de tabel

| Clinical sign | Score |
|------------------------------|------------------------------|
| Posture | 0 normal |
| | 1 Hunched back |
| Fur | 0 No, no pilo erection |
| | 1 Yes, slight pilo-erection |
| | 2 Yes, severe pilo-erection* |
| Level of locomotion activity | 0 Normal activity |
| | 1 Increased activity |
| | 2 Decreased activity |
| | 3 Withdrawal reflection |
| Skin color | 0 Normal pink |
| | 1 Pale |
| | 2 Dark red |
| Dermal Draize test | 0 Score 04 < 4 dagen |
| | 1 Score 04 > 4 dagen |
| Other | 0 |

* toepassen humane eindpunt

Indien anemie wordt vastgesteld wordt gedurende minimaal 1 week geen bloed afgenomen. Indien het dier dan nog niet voldoende hersteld is, zal het dier uit proef worden genomen

Er bestaat geen bewezen effectief uitwendig middel tegen jeuk anders dan medicatie met systemische effecten. Uitwendige toepassing van antihistaminica is niet aangewezen tegen jeuk. De Commissie Farmacotherapeutisch Kompas, van zorginstituut Nederland, adviseert op farmacotherapeutische gronden toedieningsvormen voor lokaal gebruik van tripelennamine (antihistaminicum) niet voor te schrijven. Muggenbeten zijn niet geassocieerd met pijn behalve minimale sensaties op het moment van de beten zelf. (De dieren zullen gesedeerd worden ten tijde van de muggenbeten.) Het lijkt zeer onwaarschijnlijk dat de dieren een ander ongerief dan jeuk zullen ondervinden door de muggenbeten. Daarnaast is het onlangs aangetoond dat histamine een effect heeft op de hoeveelheid parasieten in de lever na een malaria infectie in muizen, waardoor in dit geval antihistaminica liever niet worden gegeven.

De dieren zullen na te zijn blootgesteld aan de muggen op dezelfde dag intensief worden geobserveerd om te zien of ze (overmatig) krabben en zichzelf daardoor verwonden. Mocht dit inderdaad het geval zijn, zal met de IvD besproken of en zo ja welk antijeuksmiddel toe te passen.

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.

- ernstige pilo-erectie (score 2 volgens de tabel bij vraag I);

- verlies van lichaamsgewicht (> 20%)

- een totale score van > 4 volgens de tabel bij vraag I

- Indien anemie wordt vastgesteld wordt gedurende minimaal 1 week geen bloed afgenomen. Indien het dier dan nog niet voldoende hersteld is, zal het dier uit proef worden genomen.

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

0%

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.

Matig

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

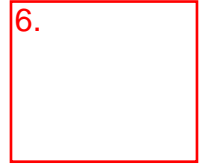
Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De *ex-vivo* de biodistributie van de Pb(PfCS@UIS4) parasieten wordt bepaald. Daartoe zullen verschillende organen gedissecteed moeten worden.

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: AVD905002015183
2. Titel van het project: Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten.
3. Titel van de NTS: Bepalen van de veiligheid van een nieuw vaccin tegen malaria.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: ██████████
 - telefoonnummer contactpersoon: ██████████
 - mailadres contactpersoon: ██████████
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 21-7-2015
 - aanvraag compleet: 16-10-2015
 - in vergadering besproken: 05-08-2015
 - anderszins behandeld: door DEC in schriftelijke e-mailronde d.d. 08-09-2015; door kleine commissie in schriftelijke e-mailrondes d.d. 16-10-2015, 16-11-2015 en 04-12-2015.
 - termijnonderbreking(en) van- / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 08-09-2015, 16-10-2015, 16-11-2015 en 04-12-2015.
 - advies aan CCD
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 08-08-2015, 18-09-2015, 04-11-2015 en 03-12-2015
- Strekking van de vragen en opmerkingen:

Correspondentie d.d. 08-08-2015 had betrekking op:

- Nadere toelichting en onderbouwing m.b.t. wetenschappelijke achtergrond, het belang van dit project, aangevuld met relevante literatuurverwijzingen.
- Nadere toelichting en onderbouwing m.b.t. bepaalde experimentele handelingen (bloedafnames, vasten, oftalmologisch onderzoek), in relatie tot het ongerief voor de dieren.
- Nadere toelichting en onderbouwing van het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, in relatie tot de vraagstelling van dit onderzoek.
- Nadere toelichting en onderbouwing m.b.t. het al dan niet nemen van maatregelen om bij de dieren jeuk a.g.v. muggenbeten te bestrijden.
- Nadere toelichting m.b.t. de in het projectvoorstelde genoemde reeds eerder uitgevoerde klinische (effectiviteits)studies.
- Tekstueel en redactioneel (verduidelijking en onderlinge afstemming van bepaalde tesktpassages en correcte invulling van het formulier).

Correspondentie d.d. 18-09-2015 had betrekking op:

- Nadere onderbouwing van het experimental design van de toegevoegde pilot-studie (m.n. het aantal muggen en de frequentie van het aantal toe te dienen muggenbeten).
- Nadere toelichting van de aard (categorie) van de doelstelling van het project.
- Nadere toelichting m.b.t. de (wetenschappelijke) onderbouwing van het project.
- Nadere toelichting en onderbouwing van het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, en daarmee een verdubbeling van het aantal dieren.
- Heldere beschrijving en onderbouwing van alle factoren die van invloed zijn op het ongerief voor de dieren (aantal muggenbeten, afzien van het gebruik van jeuk/pijnstilling, procedure rondom frequente bloedafnames, procedure m.b.t. oftalmologisch onderzoek). Inschatting van het cumulatieve ongerief.

- Nadere toelichting en onderbouwing van de wijze van monitoring van anemie.

Correspondentie d.d. 04-11-2015 had betrekking op:

- Redactioneel: Juiste invulling van het project aanvraagformulier.
- Nadere onderbouwing van het ongerief als gevolg van de gekozen infectieroute en de beoogde hoeveelheid muggenbeten.
- Nadere toelichting m.b.t. de consequenties van het gebruik van beide geslachten voor wat betreft de opzet van het experiment en m.n. de aantallen dieren; nadere onderbouwing van de aantallen dieren.
- Beschrijving van het ongerief a.g.v. het oftalmologisch onderzoek en onderbouwing van de noodzaak en frequentie van dit onderzoek.
- Nadere onderbouwing van de frequentie van de bloedafnames (in relatie tot het totale maximaal af te nemen volume).

Correspondentie d.d. 03-12-2015 had betrekking op:

- Redactioneel: finale bijstelling van enkele tekstpassages.

- Datum antwoord: 08-09-2015; 16-10-2015, 16-11-2015 en 04-12-2015.
- Strekking van de antwoorden: De vragen en opmerkingen zijn naar tevredenheid beantwoord. De aanvraag is na aanpassing 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 doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Malaria behoort wereldwijd tot een van de belangrijkste infectieziekten. Meer dan een derde van de wereldpopulatie loopt het risico om malaria te krijgen. Jaarlijks krijgen naar schatting 200 miljoen mensen malaria en sterven er meer dan een miljoen mensen aan deze ernstige ziekte. Bovendien heeft malaria een grote impact op de sociale en economische ontwikkeling, met name van de ontwikkelingslanden. Er is grote behoefte aan een goed werkzaam vaccin, dat voldoende bescherming biedt. Aan de verschillende vaccinatiestrategieën die momenteel worden onderzocht zijn diverse nadelen en beperkingen verbonden. In dit project wordt de veiligheid van een nieuw vaccin tegen malaria bestudeerd, gebaseerd op infectie ('immunisatie') met een genetisch gemodificeerde parasiet waarmee de beoogde immuunrespons kan worden opgewekt. Hiermee kan een bijdrage worden geleverd aan de ontwikkeling van een voor de mens veilig vaccin waarmee een effectieve bescherming tegen malaria infectie en eventuele doorbraakinfecties kan worden opgewekt. Een belangrijke stap in het ontwikkeltraject van vaccins is het testen op werkzaamheid en veiligheid. Het is van belang dat fabrikanten deze fase in de ontwikkeling van een vaccin kunnen laten uitvoeren door hierin gespecialiseerde bedrijven, aangezien dit ten goede komt aan de kwaliteit van de evaluatie van de vaccins.
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. De keuze hiervoor is

voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Konijnen zijn geen natuurlijke gastheer voor de gebruikte parasiet (*P.berghei*). Uit pre-klinische data blijkt dat de parasiet geen volledige cyclus kan ontwikkelen in het konijn, en dat infectie met deze parasiet derhalve ook niet leidt tot ziekteverschijnselen, maar wel een afweer respons kan opwekken. Omdat mens en konijn in dit opzicht vergelijkbare reacties op de parasiet laten zien, zijn konijnen een goed alternatief voor de in het ontwikkeltraject van het vaccin noodzakelijke humane preklinische studies met oog op werkzaamheid en veiligheid.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De dieren worden via muggenbeten geïnfecteerd met de desbetreffende parasieten, conform de overbrengingsroute bij de mens. Het ongerief wordt ingeschat als matig als gevolg van de weefselreactie op de muggenbeten en als gevolg van de biotechnische handelingen (herhaalde bloedafnames, oftalmologisch onderzoek). Naar verwachting zal er jeuk optreden als gevolg van de muggenbeten. Het gebruik van een jeukstillende middelen (bijv. antihistaminica) is niet verenigbaar met het doel van het project, aangezien er geen bewezen effectief middel hiervoor is zonder bijkomende systemische effecten die de immunologische respons moduleren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Dit type onderzoek kan alleen worden uitgevoerd in een levend dier met een intact immuunsysteem. Het konijn wordt beschouwd als de meest geschikt diersoort voor deze studies, aangezien mens en konijn vergelijkbare reacties laten zien op dit type infectie. Het is bovendien vanuit ethische overwegingen niet mogelijk dit onderzoek in proefpersonen te doen.
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 groepsgrootte (en daarmee het totale aantal dieren) is gebaseerd op richtsnoeren van de registratie autoriteit en op basis van ervaring en conventie. Een pilotproef is opgenomen om te waarborgen dat de infectie in de hoofdstudie goed verloopt.
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. De gezondheid van de dieren zal dagelijks worden gecontroleerd. De dieren zullen nadat ze zijn blootgesteld

aan de muggen intensief worden geobserveerd om te zien of ernstige jeuk optreedt. Mocht dit het geval zijn, dan wordt bezien of en zo ja welke anti-jeuk behandeling kan worden toegepast. Er zijn strikte criteria opgesteld, welke moeten waarborgen dat een dier zo min mogelijk lijdt.

10. De in deze dierproef gekozen diersoort (het konijn) kan geen malaria ontwikkelen met het daarbij behorende ongerief, maar kan wel een (immuun)respons tegen malaria geven.

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.

Elk jaar sterven meer dan een half miljoen mensen aan de gevolgen van malaria en ongeveer 200 miljoen mensen worden jaarlijks blootgesteld aan de effecten van deze infectieziekte die de kwaliteit van leven en maatschappelijke participatie negatief beïnvloeden. Bovendien heeft malaria een grote impact op de sociale en economische ontwikkeling, met name van de ontwikkelingslanden. Er is grote behoefte aan een goed werkzaam vaccin, dat voldoende bescherming biedt. Aan de verschillende vaccinatiestrategieën die momenteel worden onderzocht zijn echter diverse nadelen en beperkingen verbonden.

Met deze studie wordt een belangrijke stap gezet in het beschikbaar komen van een veilig en klinisch goed toepasbaar vaccin tegen malaria. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. Naar het oordeel van de DEC dient dit project dan ook een substantieel belang.

Tegenover dit substantiële belang staat het feit dat de dieren in deze experimenten matig ongerief zullen ondervinden.

De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling zal worden gegeven 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 onvermijdelijk voor het realiseren van de beoogde doelstellingen.

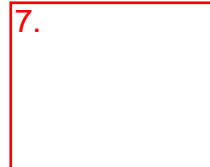
De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

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
AVD905002015183

Bijlagen

2

Datum 7 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002015183. 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:

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:

Functie:

Afdeling: BioXpert B.V.

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: BioXpert 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: 15 december 2015
Geplande einddatum: 15 december 2020
Titel project: Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten
Titel niet-technische samenvatting: Bepalen van de veiligheid van een nieuw vaccin tegen malaria
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:

7 december 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
AVD905002015183

Bijlagen

2

Datum 7 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 7 december 2015

Vervaldatum: 6 januari 2016

Factuurnummer: 15700183

| Omschrijving | Bedrag |
|--|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015183 | € 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.

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 8 februari 2016 12:08
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: [REDACTED]
Onderwerp: FW: AVD905002015183: voorgenomen besluit

Geachte mw [REDACTED], leden van de CCD;
Vriendelijk dank voor de mogelijkheid om commentaar te kunnen geven of het opleggen van onderstaande voorwaarden een effect zal hebben op de uitvoering van het project.
Ik heb hieronder (in rood) mijn reacties op de in concept gestelde voorwaarden gegeven.
De reactie is afgestemd met de opdrachtgever en de IvD van BioXpert.
Mocht u naar aanleiding van mijn reactie nog vragen hebben, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,
[REDACTED]
vergunninghouder

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: maandag 1 februari 2016 21:04
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]
Subject: AVD905002015183: voorgenomen besluit

Geachte [REDACTED],

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven van u in behandeling. Het gaat om het project 'Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten' met aanvraagnummer AVD905002015183.

De CCD heeft uw aanvraag besproken en is voornemens deze goed te keuren. De CCD wil echter twee voorwaarden toevoegen aan de vergunning die mogelijk consequenties zouden kunnen hebben voor de uitvoering van uw project. Deze voorwaarden en de argumentatie hiervoor vindt u hieronder.

U heeft mij nog gebeld of de voorwaarde dat de projectvergunning maar 2 jaar geldig is een probleem zal opleveren. Ik kan u antwoorden dat dit geen probleem zal opleveren.

Voorgenomen voorwaarde 1:

Een dierenarts dient tijdens de periode van het vasten dagelijks te controleren of de gezondheid van de dieren, en dan met name de werking van de darmen, het herhaaldelijk en met een kort interval vasten toelaat.

Onderbouwing:

U heeft aangegeven dat dieren om de 14 dagen nuchter en onder sedatie geïmmuniseerd worden. Daarnaast zal maximaal 28-maal nuchter bloed afgenomen worden met een interval variërend van 1-13 dagen. U beschrijft dat de dieren van het eind van de werkdag tot het begin van de volgende werkdag zullen vasten. Konijnen mogen echter niet te lang vasten, omdat de darmen op den duur volledig stilgelegd worden. Vanuit dat oogpunt, vindt de CCD de frequentie van vasten vrij hoog en duur van vasten lang. De CCD wil bovenstaande voorwaarde toevoegen om te borgen dat de gezondheid van de dieren niet onnodig gevaar loopt.

Voorwaarde 1

- Wij zijn ons goed bewust dat konijnen gevoelige darmen hebben. De term vasten behoeft hier echter nadere uitleg:
Konijnen krijgen (zowel voor als tijdens de uitvoering van experimenten) normaal dagelijks in de ochtend 80% van ad lib brok toegediend (ca 100g per dier) en een pluk hooi. Hiermee blijven dieren goed op gewicht en wordt obesitas voorkomen. De dieren hebben hun brok en hooi in de loop van de middag volledig opgegeten. Coprofagie is gewoon toegestaan.
De volgende voergift is altijd binnen 24 uur (+/- 1uur). Met dit voederpatroon worden nooit problemen gezien. Deze praktijk wordt ook in bijna alle proefdierfaciliteiten toegepast.
- Feitenlijk is er geen sprake van vasten, maar dienen de handelingen (bloed afnemen/immuniseren) vóór de voergift te worden uitgevoerd zodat nuchtere bloedwaardes gemeten kunnen worden en de dieren nuchter gesedeerd kunnen worden voor immunisatie.
Na de handelingen ontvangen alle dieren direct hun brok en hooi. Gezien deze uitleg lijkt ons dagelijks

toezicht door een dierenarts niet nodig. Uiteraard zullen we het defaecatie patroon goed in de gaten houden en bij afwijkingen contact opnemen met een dierenarts.

Voorgenomen voorwaarde 2:

De aanvrager dient in overleg met de IvD het ongerief van de dieren dat veroorzaakt wordt door jeuk in bijlage 3.4.4.1 te beperken.

Voorwaarde 2:

Op grond van eerder uitgevoerde studies door opdrachtgever in samenwerking met IMM Lisboa, in Portugal worden wel huidreacties verwacht, maar niet gepaard gaande met jeuk. In deze studies zijn konijnen 3 keer blootgesteld aan 75 muggen, zonder dat er jeukeffecten geconstateerd werden. Het tegen gaan van krabben en bijten door eventuele kappen is daarom ook niet toegevoegd aan de studie.

Daarnaast zal in de pilot studie al zeer zorgvuldig worden geobserveerd of de dieren geen jeuk zullen krijgen. In het geval dat er toch forse jeuk met krabben geobserveerd wordt, zal eventueel mentholpoeder als verzachtend middel gebruikt (kunnen) worden. Het toevoegen van bijvoorbeeld Azaron, en elke andere vorm heeft mogelijk invloed op studie zoals ook uitgelegd aan de DEC.

"Er bestaat geen bewezen effectief uitwendig middel tegen jeuk anders dan medicatie met systemische effecten. Uitwendige toepassing van antihistaminica is niet aangewezen tegen jeuk. De Commissie Farmacotherapeutisch Kompas, van zorginstituut Nederland, adviseert op farmacotherapeutische gronden toedieningsvormen voor lokaal gebruik van tripelennamine (antihistaminicum) niet voor te schrijven. Verder is onlangs aangetoond dat histamine een effect heeft op de hoeveelheid parasieten in de lever na een malaria infectie in muizen, waardoor antihistaminica niet zijn geïndiceerd. Muggenbeten zijn niet geassocieerd met pijn behalve minimale sensaties op het moment van de beten zelf (de dieren zullen echter gesedeerd worden ten tijde van de muggenbeten)." Dus het gebruik van een middel dat de roodheid, zwelling en jeuk tegengaat, is helaas niet verenigbaar met het doel van dit projectvoorstel.

De IvD zal verzocht worden elke steekronde toezicht te houden op het optreden van eventuele jeuk.

Onderbouwing:

U heeft aangegeven aan dat in bijlage 3.4.4.1 de dieren nadat ze gestoken worden niet worden gedood. Tegelijkertijd wordt het ongerief van de dieren door jeuk niet verminderd. De argumentatie voor het niet behandelen van de jeuk lijkt niet van toepassing op het desbetreffende experiment. De CCD vraagt zich af of dit wel een wenselijke situatie is en wil bovenstaande voorwaarde toevoegen om het ongerief van de dieren door jeuk te beperken.

Aangezien bovengenoemde voorwaarden mogelijk de uitvoering van uw project kunnen beïnvloeden, wil de CCD u nog in de gelegenheid stellen te reageren op deze voorwaarden alvorens zij een definitief besluit neemt. Daarnaast willen wij de DEC vragen de CCD aanvullend te adviseren over deze voorwaarden. Indien uw reactie of het aanvullend advies van de DEC daar aanleiding toe geeft, kan de CCD haar voorgenomen besluit nog herzien.

Om u hiervoor de gelegenheid te kunnen geven, en uw reactie vervolgens tijdens de CCD vergadering te kunnen bespreken, dienen wij de behandeltermijn op te schorten. Hoewel de CCD uw aanvraag binnen de wettelijke termijn van 40 werkdagen heeft beoordeeld, zullen we, door u in de gelegenheid te stellen te reageren op het voorgenomen besluit, de termijn van 40 werkdagen overschrijden. Wij kunnen u daarom alleen in de gelegenheid stellen te reageren, indien u instemt met het opschorten van de behandeltermijn totdat de CCD uw aanvraag opnieuw kan bespreken en een definitief besluit kan nemen.

Ik ben akkoord met het opschorten van de termijn met de in de wet gestelde periode zoals ik u telefonisch heb laten weten.

Indien u gebruik wilt maken van de mogelijkheid te reageren op de voorgenomen voorwaarden, verzoeken wij u in te stemmen met het opschorten van de behandeltermijn en ons hiervan uiterlijk woensdag 03 februari 2016 op de hoogte te stellen.

Indien u gebruik maakt van bovenstaande mogelijkheid, wordt u verzocht uiterlijk maandag 8 februari 2016 inhoudelijk te reageren en eventueel aanvullende informatie aan te leveren. Wij zullen uw reactie vervolgens doorsturen naar de DEC die advies heeft uitgebracht over uw aanvraag en deze vragen de CCD naar aanleiding van uw reactie aanvullend te adviseren over bovengenoemde voorwaarden.

Mocht u geen gebruik willen maken van de mogelijkheid te reageren of instemmen met de voorgenomen voorwaarden, verzoeken wij u ons dat ook uiterlijk 3 februari 2016 te laten weten. Het voorgenomen besluit zal dan definitief gemaakt worden. Indien wij dan niets van u gehoord hebben, gaan wij er ook van uit dat u geen gebruik wilt maken van de mogelijkheid de aanvullende informatie te verstrekken.

Wij wachten uw reactie af.

Met vriendelijke groet,

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629.

The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

Nistelrooisebaan 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
AVD905002015183

Uw referentie

Datum 02 maart 2016
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte [REDACTED]

Op 07 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten' met aanvraagnummer AVD905002015183. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 08 februari 2016 heeft u digitaal gereageerd op ons voornemen voorwaarden te verbinden aan de vergunning.

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 'Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten' starten. De vergunning wordt afgegeven van 02 maart 2016 tot en met 02 maart 2018.

Voorwaarde

Aan deze vergunning is de voorwaarde verbonden zoals genoemd in de vergunning en hieronder toegelicht.

Op basis van uw aanvraag waren wij voornemens twee specifieke voorwaarden te verbinden aan de vergunning waardoor geborgd zou worden dat 1) de gezondheid van de dieren niet onnodig gevaar loopt door het vasten en 2) het ongerief van de dieren door jeuk beperkt wordt.

Op 01 februari 2016 hebben wij u in de gelegenheid gesteld te reageren op deze voorgenomen voorwaarden. Ook hebben wij de DEC gevraagd ons aanvullend te adviseren. Aangezien u in uw reactie van 08 februari 2016 benadrukt heeft dat de dieren niet vasten en de DEC dit in haar aanvullend advies bevestigd heeft, is de voorwaarde die hierop zag komen te vervallen.

U heeft daarnaast aangegeven dat, hoewel er naar alle waarschijnlijkheid geen jeuk zal optreden, dit wel gemonitord zal worden en dat de IvD gevraagd zal worden hierop toezicht te houden. Als mogelijke jeuk verminderende maatregel die niet de uitkomstparameters van de proef beïnvloedt, noemt u mentholpoeder. Uit uw reactie begrijpen wij dat u onze mening deelt dat het belangrijk is te monitoren of de dieren jeuk hebben en, indien nodig, maatregelen genomen worden om dit ongerief te beperken. Naar aanleiding van de door u verstrekte informatie en het aanvullend advies van de DEC hebben wij de voorwaarde geherformuleerd.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie [REDACTED] gevraagd zoals ontvangen op 07 december 2015. Op 02 februari 2016 hebben wij de DEC in de gelegenheid gesteld ons aanvullend te adviseren naar aanleiding van ons voornemen een voorwaarde te verbinden aan de vergunning. Op 09 februari 2016 heeft de DEC ons een aanvullend advies toegestuurd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is zowel het advies als het aanvullend advies van de DEC betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit. Wij nemen het advies van de Dierexperimentencommissie grotendeels over met uitzondering van bovenstaande afwijkingen. In aanvulling op het DEC advies hebben wij ook een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

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 het colofon.

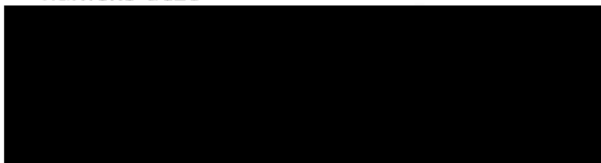
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv 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

Datum
02 maart 2016

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015183

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 B.V.
Adres: Nistelrooisebaan 3
Postcode en woonplaats: 5374 RE Schaijk
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 02 maart 2016 tot en met 02 maart 2018, voor het project 'Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten' met aanvraagnummer AVD905002015183, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED]. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies om te borgen dat eventueel ongerief van de dieren door jeuk beperkt wordt.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 07 december 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 07 december 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 07 december 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 07 december 2015 en aanvullend advies van de Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 09 februari 2016
 - d. Aanvullende informatie, zoals ontvangen bij digitale indiening op 08 februari 2016

| Naam dierproef | Diersoort | Aantal dieren | Ernst |
|--|-----------|---------------|-------|
| 3.4.4.1: Pilotexperiment: Bepalen of de veiligheid van het vaccin in voldoende mate kan worden vast gesteld met het voorgestelde aantal muggen (haalbaarheidsstudie) | Konijn | 5 | Licht |
| 3.4.4.2: Bepalen van de biodistributie en toxiciteit / veiligheid van een vaccin tegen malaria bestaande uit genetisch gemodificeerde Pb(PfCS@UIS4) parasieten | Konijn | 40 | Matig |

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen.

1) Indien jeuk optreedt zal met de IvD worden afgestemd of het noodzakelijk is de jeuk te beperken door middel van een jeuk verminderende maatregel die niet de meetparameters van het experiment beïnvloedt, bijvoorbeeld mentholpoeder.

Algemene voorwaarde

2) 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 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 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 blijven schade

Datum

02 maart 2016

Onze referentieAanvraagnummer
AVD905002015183

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.