

Inventaris Wob-verzoek W21-04										
		wordt verstrekt			weigeringsgronden					
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraagformulier				x		x		x	
2	NTS	x								
3	projectvoorstel				x				x	
4	Bijlage dierproeven 1				x				x	
5	Bijlage dierproeven 2				x				x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x			
7	DEC advies				x		x		x	
8	aanvullende vragen				x		x			
9	reactie op vragen				x		x			
10	Advies CCD				x		x			x
11	Beschikking en vergunning				x		x			



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.centralecommissiedierproeven.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 50200 <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 colspan="2">Biomedical Primate Research Centre</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>10.2.e</td><td></td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>41146967</td><td></td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Lange Kleiweg</td><td>161</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>3306</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>2288 GJ</td><td>Rijswijk</td></tr><tr><td>IBAN</td><td></td><td>10.2.g</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">Stichting Biomedical Primate Research Centre</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Biomedical Primate Research Centre		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e		KvK-nummer	41146967		Straat en huisnummer	Lange Kleiweg	161	Postbus	3306		Postcode en plaats	2288 GJ	Rijswijk	IBAN		10.2.g	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting Biomedical Primate Research Centre	
Naam instelling of organisatie	Biomedical Primate Research Centre																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e																									
KvK-nummer	41146967																									
Straat en huisnummer	Lange Kleiweg	161																								
Postbus	3306																									
Postcode en plaats	2288 GJ	Rijswijk																								
IBAN		10.2.g																								
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Stichting Biomedical Primate Research Centre																									
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>	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>10</td><td></td><td>XDhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>10.2.g</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>10.2.g</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>10.2.e</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>10.2.e</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	10		XDhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	10.2.g			Afdeling	10.2.g			Telefoonnummer	10.2.e			E-mailadres	10.2.e						
(Titel) Naam en voorletters	10		XDhr. <input type="checkbox"/> Mw.																							
Functie	10.2.g																									
Afdeling	10.2.g																									
Telefoonnummer	10.2.e																									
E-mailadres	10.2.e																									
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>10</td><td></td><td><input type="checkbox"/> Dhr. X Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>10.2.e en 10.2.g</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td><td>.nl</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	10		<input type="checkbox"/> Dhr. X Mw.	Functie	10.2.e en 10.2.g			Afdeling				Telefoonnummer				E-mailadres			.nl				
(Titel) Naam en voorletters	10		<input type="checkbox"/> Dhr. X Mw.																							
Functie	10.2.e en 10.2.g																									
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres			.nl																							

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
Functie
Afdeling
Telefoonnummer
E-mailadres

Dhr. Mw.

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 01 - 01 - 2018

Einddatum 31 - 12 - 2022

3.2 Wat is de titel van het project?

Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of next-generation rabies-flavivirus combination vaccines

3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Evaluatie van een nieuwe vaccinproductietechnologie voor de ontwikkeling van volgende generatie rabiës-flavivirus-combinatievaccins

3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC 10.2.g

Postadres

E-mailadres 10.2.e

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 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
- 2 bijlages

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 10.2

Functie 10.2.g

Plaats Rijswijk

Datum 03 - 11 - 2017

Handtekening 10.2.e en 10.2.g



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 this project, we will evaluate an innovative technology for the production of vaccines against human pathogens, the Plasmid-Launched Live-Attenuated Vaccine (PLLAV) technology, in rhesus macaques. We will 1) develop a protocol for the administration of vaccines manufactured using this technology, and 2)

will assess the efficacy of PLLAVs targeted to important human viral pathogens.

PLLAV technology

The PLLAV technology is based on a plasmid vector that carries a complete genome of a live-attenuated yellow fever virus that is derived from the YFV-17D vaccine strain. After immunization with this plasmid, named **PLLAV-YFVax**, live-attenuated YFVs are expressed that subsequently transiently replicate in the vaccine-recipient. Replication then triggers an immune response that is comparable to the response induced by commercially available live-attenuated YFV vaccines. A strong proof-of-concept for this technology has already been obtained in rodent animal models where PLLAV-YFVax protected hamsters against infection with the pathogenic YFV-Asibi strain. PLLAV-YFVax has been used in a small proof-of-concept immunogenicity study in rhesus macaques and induced anti-YFV neutralizing immune responses.

The PLLAV technology is highly versatile because the plasmid vector can easily be adapted to express antigens from other pathogens:

- The prM-E genes of YFV-17D, encoding the matrix (prM) and envelope (E) structural proteins, can be exchanged for prM-E genes of other flaviviruses, like the Japanese encephalitis virus (JEV), resulting in PLLAVs that are capable of inducing an immune response to the respective viruses. This technique is known as 'Chimerivax'. A chimeric PLLAV-YFVax with the prM-E genes of live-attenuated JEV (**PLLAV-JEVax**) has been constructed using this technique (Figure 1). PLLAV-JEVax induced seroconversion in mice with similar efficiency as the commercial JEV vaccine Imojev[®].

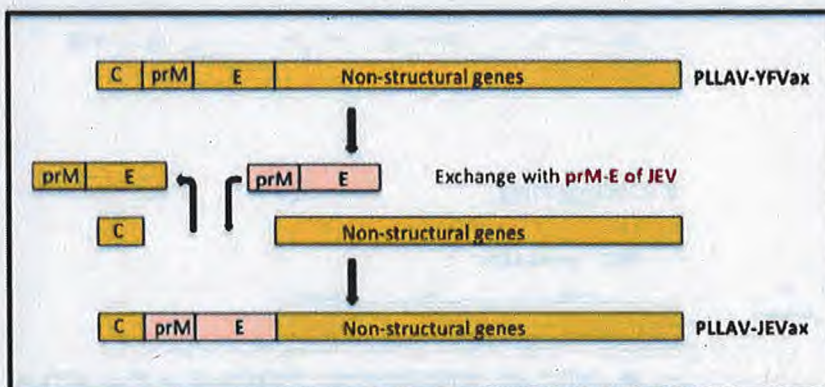


Figure 1. Construction of PLLAV-JEVax using the Chimerivax technique.

- Additionally, within the viral genome backbone of the PLLAV, either -YFVax or -JEVax, foreign epitopes can be inserted at different sites in the genome, and are co-expressed on the attenuated viruses expressed by the PLLAVs ('dual-target PLLAV'). In the **RABYD-VAX project** which is described below, both PLLAV-YFVax and PLLAV-JEVax will be adapted so that these constructs will be co-expressing the rabies virus G protein (named **PLLAV-YFVax-RABV** and **PLLAV-JEVax-RABV**, respectively). The potential cloning sites for the RABV G protein gene in the YFV/JEV genome are depicted in figure 2.



Figure 2. Cloning sites of foreign epitopes in PLLAV-YFVax and PLLAV-JEVax

The resulting PLLAV-YFVax-RABV induces dual protection against YFV and the classical rabies virus (RABV), while PLLAV-JEVax-RABV is aimed to protect against JEV and RABV infection.

In addition to the extreme flexibility of the technology, PLLAVs combine the benefits of classical DNA vaccines and live-attenuated viruses (Figure 3), but without the disadvantages that are inherent to these vaccine technologies, like:

- Complex, time-consuming, and costly vaccine production,
- Risk of reversal to pathogenicity,
- Lack of immunogenicity, and
- The requirement of a cold chain for vaccine transport and storage.

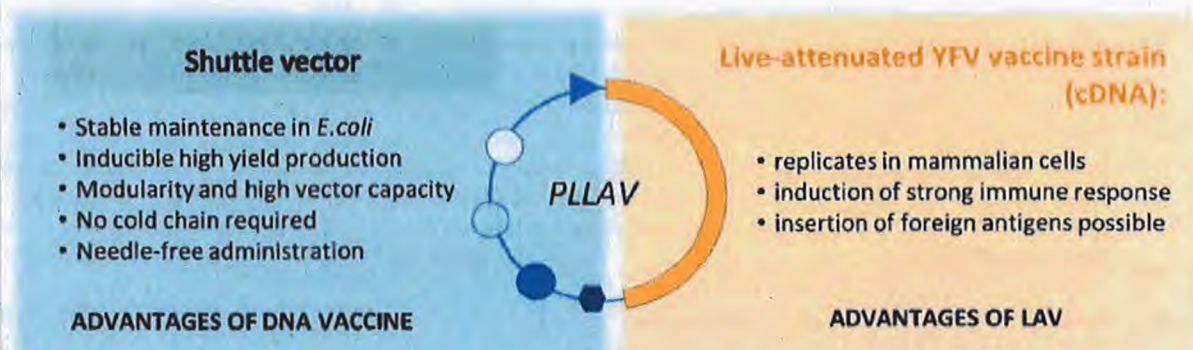


Figure 3. Combined advantages of PLLAV over 'classical DNA and live-attenuated vaccines

Together, its qualities make the PLLAV technology pre-eminently suitable for the production of vaccines for people living in rural areas in tropical countries. Because there is no need for a cold chain for vaccine transport and storage, and because the simpler vaccine manufacturing process will result in lower prices, the PLLAV technology will considerably improve the access to vaccines for this group of people. Additionally, this technique will greatly accelerate the vaccine production in case of sudden disease outbreaks.

The RABYD-VAX project

Vaccines offer a safe and cost-effective way to protect people against infectious diseases. Yet, many poverty-related, infectious diseases escape attempts to develop effective vaccines. These so-called '**neglected tropical diseases (NTDs)**' are the most common infections of the world's poor, and almost all of the 1.4 billion people who live below the poverty level (as defined by the World Bank) suffer from one or more of these diseases [1].

Rabies is one of the most important NTDs identified by the World Health Organization. Rabies is a devastating disease for which the mortality rate and burden *per capita* fall disproportionately upon the poorest regions of the world. Rabies is caused by the **rabies lyssavirus (RABV)** that is transmitted to humans via a bite by infected animals, predominantly dogs. In addition, a number of carnivores, like foxes and raccoons, and bat species also serve as natural reservoirs [2]. In humans, once the first clinical symptoms (such as hydrophobia) have developed, the disease is uniformly lethal, and patients die in great agony.

Disease awareness, responsible dog ownership, and wildlife vaccination are considered to be key components in the control and prevention of rabies infections [2]. However, such strategies are usually not feasible in vast, resource-limited, rabies-endemic regions such as Africa, Latin America, and Asia. A combination of weak veterinary health programs, large stray dog populations, inadequate health monitoring of domestic dogs, and wild animal species that can serve as natural reservoirs for the virus are important hurdles in the decision-making process to implement efficient control measures for rabies transmission [3]. Consequently, **rabies still causes 58.000 human deaths every year**, mostly in rural areas of Africa and Asia. The majority are children of young age (<15 years), who are at high risk from being bitten while playing with animals, but who are also at risk from receiving the more severe bites

(head wounds) due to their small size. This makes rabies also an important pediatric disease. It is thought that only 3% of rabies cases in humans are reported, and this lack of reliable data has a negative impact on the priority that is needed to control rabies [4,5]. It is estimated that rabies annually causes over 3.7 million disability-adjusted life years (DALY = YLL (Years of Life Lost) + YLD (Years Lived with Disabilities)), and 8.6 billion USD economic losses in the world's poorest economies [6]. An extra hurdle in the eradication of rabies is that infections with lyssaviruses that are closely related to the classical RABV, for instance Duvenhage virus, Mokola virus or Lagos Bat virus, are often mistakenly diagnosed as caused by RABV. Relatively little is known of these African lyssaviruses, but because of their zoonotic potential they pose a serious threat to humans living in regions of Africa where these viruses are endemic [7].

Currently, several efficient rabies countermeasures exist, like prophylactic animal and human vaccination, post-exposure prophylaxis with a combination of immunoglobulins, and a vaccine regimen (Rabipur®). Despite, they still fail to prevent human rabies in the main target group: children in endemic areas. The need for a cold chain for transport and storage of vaccines, the necessity of multiple doses, administration by needle, and the overall high cost are the main factors that in combination impede large-scale vaccination campaigns in rabies-endemic regions in the poor, rural areas of Africa, Latin America and Asia. The best strategy to eliminate human rabies is the development of a cheap, stable and potent (one-dose) prophylactic childhood rabies vaccine. This is the primary focus of the EU Horizon2020 RABYD-VAX project.

Yellow fever virus (YFV) and Japanese encephalitis virus (JEV) are also focus of the RABYD-VAX project. They are not NTDs, but are major infectious disease agents for which vaccines and vaccine production can be significantly improved. The YFV is a mosquito-borne flavivirus that causes severe and life-threatening infections with jaundice, systemic bleeding, shock and multi-organ failure. An estimated 900 million people living in 45 countries of Africa and Latin America are at risk of infection. Although live-attenuated prophylactic vaccines [YFV-17D, Stamaril® and YF-Vax®] are available, 200,000 cases of yellow fever still occur annually, resulting in ~30,000 deaths, mainly because of inadequate supplies, the need for trained staff, and the need of a cold chain for vaccine storage [5,8]. The current YFV vaccine production process is also hard-to-scale-up and low-tech, and production capacity cannot react to a rapid depletion of the global emergency stockpile of about 6 million vaccine doses as has been dramatically exemplified by the 2016 yellow fever outbreak in Africa [9]. As a consequence, yellow fever may be impossible to contain when the virus is introduced into African mega-cities such as Kinshasa, or into new vulnerable populations (e.g. in Southern China or other regions of Asia where the *Aedes aegypti* mosquito vector is highly prevalent) [10].

The Japanese encephalitis virus is also a mosquito-borne flavivirus and causes viral encephalitis in many countries of Asia with an estimated 68,000 clinical cases every year. The case-fatality rate among the patients that develop encephalitis is up to 30% and permanent neurologic or psychiatric sequelae are reported in 30-50% of cases. More than 3 billion people are at risk of this infection [11]. A live-attenuated JEV vaccine (Imojev®) is on the market, but this vaccine suffers from the same disadvantages as the YFV vaccines.

The primary aim of the EU Horizon2020 RABYD-VAX project is to develop an efficacious and safe vaccine against rabies. In addition, an inexpensive, easy-to-produce, easy-to-handle, and easy-to-administer in one shot, combination-vaccine against both rabies and YFV (for use in Latin America and Africa), or against JEV and rabies (for use in Asia) would be of great value to the health of people living in areas where these viruses are endemic. As partner in the EU-funded project RABYD-VAX we will evaluate the immunogenicity and protective capacity of vaccines targeted to RABV and YFV, or RABV and JEV that are based on the newly developed PLLAV technology.

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 objectives of this project are to:

- 1) develop an immunization protocol for use with PLLAV-based vaccines, and to
- 2) evaluate the efficacy of novel PLLAV-based vaccines in rhesus macaques.

Our institute has a long-standing expertise in conducting vaccine evaluation studies using nonhuman primates. The institute has a large breeding colony of rhesus monkeys that are genetically characterized and are free from specific viruses. The institute has the infrastructure and expertise available to perform the studies safely at the appropriate biosafety level. We have the appropriate immunological assays for assessment of cellular, humoral and innate immune responses against the vaccines.

The institute's long-standing experience with vaccine evaluation studies and pathogenic viruses guarantees that these animal studies will be adequately performed and will be finished within the planned project period.

3.3 Relevance

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

This project is part of a larger research project with the ultimate goal to develop PLLAV-YFVax as universal vaccine platform technology for emerging infectious diseases, not limited to only viral infections.

In the last two decades, the world experienced several outbreaks of virus infections caused by then unknown or less-known viruses, like Ebola, Zika, SARS, MERS, West Nile, Chikungunya, and avian influenza virus. These so-called 'emerging infectious diseases' or 'EIDs' are likely caused by (combinations of) socio-economic, environmental, and ecological factors, like climate change, international travel, changes in land use or agricultural practices etc. [12,13,14].

The abruptness of the outbreaks, that are associated with considerable morbidity and mortality, emphasizes the importance of the development of vaccines and antiviral compounds against EIDs [15,16]. As a result, there is a great demand for vaccine technologies that allow rapid development of safe and easy-to-produce vaccines against emerging infectious agents.

The successful development of PLLAV-YFVax-RABV and PLLAV-JEVax-RABV will be a major step towards the development of PLLAV-YFVax as a universal vaccine platform for EID, but also for other infectious agents.

3.4 Research strategy

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

The overall design of this project consists of the following phases:

1. Optimization of the delivery method for PLLAV-based vaccines in order to most efficiently target the vaccines to the immune system
2. Validation of PLLAV technology by direct comparison with commercial vaccine, and
3. Preclinical evaluation of the efficacy of 'dual-target-virus' vaccines directed to YFV/rabies and JEV/rabies (PLLAV-YFVax-RABV and PLLAV-JEVax-RABV)

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.

In the first phase, we will develop the optimal protocol for the PLLAV delivery in rhesus macaques, with a specific focus on the intradermal delivery of vaccines. Intradermal delivery has gained interest in the recent years. This is driven by the fact that the dermis and epidermis of human skin are rich in antigen-presenting cells suggesting that delivery of vaccines to these layers, rather than to muscle or subcutaneous tissue, should be more efficient and could induce protective immune responses with smaller amounts of vaccine antigen [17]. Indeed, experiments in rodents have shown that protective anti-YFV immune responses can easily be induced by intradermal immunization using minute amounts of vaccine antigen and when applied into the skin dermal layers.

PLLAV-YFVax will be used to develop the best strategy for the delivery of the novel vaccines to the immune system. The animal procedure used in this phase of the project is described in **Appendix 1**:

'Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques'

The selected protocol will subsequently be applied to validate the PLLAV technology by testing the efficacy of the PLLAVs in macaques (**Appendix 2**). In this phase, we will use PLLAVs directed to YFV, JEV and rabies virus, developed in the context of the H2020 RABYD-VAX project, as prototype PLLAVs for the validation of this vaccine technology. Importantly, because the immune correlates of protection for YFV, JEV and RABV are known [5,11,18,19], these efficacy studies only consist of an immunization follow-up phase without the need of an experimental virus infection to control for protection.

During all studies, the animals are closely monitored and investigated for potential adverse health effects of the immunizations. Also, blood samples are taken regularly to measure the vaccine-induced immune responses. The presence of neutralizing antibody titers after the vaccinations, comparable to those induced by commercial vaccines will be used as the prime readout for success.

All vaccines, or vaccine protocols, which will be evaluated in this project meet the criteria drawn up for experiments in non human primates:

1. The vaccine, or vaccine components must have been tested in cell cultures or in small animal models for absence of toxicity
2. The vaccine strategy used must be novel. This strategy has never been tested in other NHP studies. This may relate to the choice of antigen, the formulation with adjuvant or other carrier, the route of administration, or the manner in which the vaccine is administered.
3. The vaccines cannot be adequately tested for their capacity to induce protective immune responses in other than in nonhuman primate animal models
4. New vaccine candidates will be tested in non human primates after the immunogenicity of the vaccine has been proven in other animal models

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 PLLAV technology has already successfully been used in mice and hamsters, but immune responses measured in these small animal models are not necessarily predictive for the outcome of a similar study in humans. The rodent immune system is evolutionary quite divergent from the human system, and as a result the vaccine induced immune responses in rodents generally have a limited predictive value for vaccine effectiveness in humans [20-23].

A first, small scale study using the PLLAV technology in macaques has been completed at the institute (DEC#753C). The intradermal immunization protocol used in that study was comparable to that used in rodents. Using PLLAV-YFVax, a vigorous anti YFV immune response, comparable to the immune responses detected in control animals that received a commercial YFV vaccine, was induced in one animal. However, immune responses were undetectable in the remaining three macaques. These findings provide a proof-of-concept for the PLLAV technology in macaques, but also emphasize the need for further improvement of the immunization protocol.

To that end, we will systematically investigate several parameters involved in the targeting of the PLLAVs to the dermal skin layer. In contrast to conventional DNA vaccines, the live-attenuated vaccine viruses that are produced by PLLAV YFVax not only rely on skin cells for the production of live-attenuated viruses, but also on the proximity of small blood capillaries in the skin for their dissemination throughout the body. Parameters that will be evaluated include the vaccine delivery method, the amount of DNA, and the use of carrier molecules for more efficient transcription/translation of the DNA.

Because the rodent skin is much thinner than that of humans this significantly influences the efficiency of intradermal administration and expression of the PLLAVs [24,25]. It is thus vital to evaluate this technology in an animal model whose skin tissue architecture and the composition of the skin immune cell populations are comparable to the human skin. Studies have shown that the skin architecture of macaques is comparable to that of humans, and that immune cell populations in the macaque skin are similar to those in humans [24-26].

The first phase of the project will therefore be used to investigate the delivery of PLLAVs to the skin of macaques. The local replication of the attenuated viruses, and the skin reaction to the vaccine virus replication, will be analyzed in skin biopsies as prime indicators for effective immunization.

The immunization protocol that induces an optimal combination of virus replication and induction of skin

immune reaction will be selected to study the protective efficacy of the PLLAV-YFVax in macaques. This phase is intended to validate vaccine production by the novel technology by showing the non-inferiority of PLLAV-YFVax against a well-characterized commercially available yellow fever vaccine, Stamaril®. Stamaril® is specifically used in this study as control-comparator because the YFV genome that is used in the PLLAV is derived from this live-attenuated vaccine. In this important validation step of the PLLAV technology, the neutralizing antibody titers against YFV will be the prime read-out, and will be compared to antibody titers induced in macaques immunized with Stamaril®. Importantly, because the immune correlates of protection for YFV are known [5,11,18] this study only consists of an immunization follow-up phase without the need of an experimental YFV infection to control for protection.

This study is essential to prove that the PLLAV vaccine technology protocol using PLLAV-YFVax reliably induces YFV-neutralizing antibody responses that meet, or even exceed, the known immune correlates of protection for humans. For the immune response against YFV, based on the studies in macaques, the Food and Drug Administration approved a log₁₀ neutralization index (LNI) >0.7 as a surrogate for protection against YFV infection. As an alternative, a plaque reduction neutralization test can also be used to replace the LNI [27].

Only when this milestone is reached (LNI >0.7 in majority of animals), the novel dual-target PLLAV-YFVax-RABV and PLLAV-JEVax-RABV will be evaluated in macaques in the final phase of the project. As for the YFV vaccine, the immune correlates of protection for JEV and rabies virus in rhesus macaques are already known. For a rabies vaccine to induce a protective response, neutralizing antibody titers ≥0.5 IU/ml serum will have to be reached, a threshold that is generally accepted as an adequate criterion for a protective immune response against rabies after vaccination [28]. For JEV vaccines, the World Health Organization (WHO) defined the correlate of immunity as a 50% plaque reduction neutralization test (PRNT₅₀) value of ≥1:1. This value is also generally accepted as criterion for a protective immune response for all flavivirus vaccines. Like for the single-target PLLAV-YFVax, assessment of the immune response after immunization of the animals will be sufficient and an experimental infection is not needed.

References to text

1. Hotez, P. (2011). A Handful Of 'Antipoverty' Vaccines Exist For Neglected Diseases, But The World's Poorest Billion People Need More. *Health Affairs*, 30(6), 1080-1087.
2. WHO (2013). Expert Consultation on Rabies. Second report (pp. 1-150).
3. Arechiga Ceballos *et al.* (2014). Control of canine rabies in developing countries: key features and animal welfare implications. *Rev Sci Tech*, 33:311-321
4. Knobel, D. L., Cleaveland, S., Coleman, P. G., Fèvre, E. M., Meltzer, M. I., Miranda, M. E. G., *et al.* (2005). Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(5), 360-368.
5. Staples, J. E., Gershman, M., and Fischer, M. (2010). Yellow fever vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR*, 59, RR-7, 1-22.
6. Hampson, K., Coudeville, L., Lembo, T., Sambo, M., Kieffer, A., Attlan, M., *et al.* (2015). Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(4), e0003709
7. Johnson, N., Vos, A., Freuling, C., Tordo, N., Fooks, A. R., and Müller, T. (2010). Veterinary Microbiology. *Veterinary Microbiology*, 142(3-4), 151-159.
8. Monath, T. P. (2013). 17D Yellow Fever Virus Vaccine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(6), 1225-1225.
9. Barrett, A. D. T. (2016). Yellow Fever in Angola and Beyond-The Problem of Vaccine Supply and Demand. *The New England Journal of Medicine*, 375(4), 301-303.
10. Wasserman, S., Tambyah, P. A., and Lim, P. L. (2016). Yellow fever cases in Asia: primed for an epidemic. *International Journal of Infectious Diseases*, 48, 98-103.
11. McArthur, M. A., and Holbrook, M. R. (2011). Japanese Encephalitis Vaccines. *Journal of Bioterrorism and Biodefense*, Suppl 1(002).
12. Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., and Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993.
13. Morse, S. S., Mazet, J. A., Woolhouse, M., Parrish, C. R., Carroll, D., Karesh, W. B., *et al.* (2012).

Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *The Lancet*, 380(9857), 1956–1965.

14. Woolhouse, M. E. J., and Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1842–1847.
15. Debing, Y., Jochmans, D., and Neyts, J. (2013). Intervention strategies for emerging viruses: use of antivirals. *Current Opinion in Virology*, 3(2), 217–224.
16. García-Sastre, A., and Mena, I. (2013). Novel vaccine strategies against emerging viruses. *Current Opinion in Virology*, 3(2), 210–216.
17. Hickling *et al.* (2011) Intradermal delivery of vaccines: potential benefits and current challenges. *Bulletin of the World Health Organization* 89,221-226.
18. Gotuzzo, E., Yactayo, S., and Cordova, E. (2013). Efficacy and Duration of Immunity after Yellow Fever Vaccination: Systematic Review on the Need for a Booster Every 10 Years. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(3), 434-444.
19. Moore, S. M., and Hanlon, C. A. (2010). Rabies-Specific Antibodies: Measuring Surrogates of Protection against a Fatal Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(3), e595.
20. Bolker, J. (2012). Model organisms: There's more to life than rats and flies. *Nature*, 491(7422), 31–33.
21. Louz, D., Bergmans, H. E., Loos, B. P., & Hoeben, R. C. (2013). Animal models in virus research: their utility and limitations. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), 325–361.
22. Smith, D. R., Holbrook, M. R., & Gowen, B. B. (2014). Animal models of viral hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 112(C), 59–79.
23. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 4(12), 62–82.
24. Avci, P., *et al.* (2013) Animal models of skin disease for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.*, 8(3): 331–355.
25. Jung, E.C. and Maibach, H.I. (2014) Animal models for Percutaneous Absorption. In: *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration*. p21-30.
26. Adam, I., Rosenbaum, P., Cosma, A., Le Grand, R., and Martinon, F. (2015) Identification of skin immune cells in non-human primates. *Journal of Immunological Methods*, 426, 42-49.
27. Gotuzzo, E. *et al.* (2013). Efficacy and Duration of Immunity after Yellow Fever Vaccination: Systematic Review on the Need for a Booster Every 10 Years. *A. J. Trop. Med. Hyg.* 89(13),434-444.
28. DiStefano, D. *et al.* (2013). Immunogenicity of a reduced-dose whole killed rabies vaccine is significantly enhanced by ISCOMATRIX™ adjuvant, Merck amorphous aluminum hydroxylphosphate sulfate (MAA) or a synthetic TLR9 agonist in rhesus macaques. *Vaccine*, 31(42), 4888-4893
29. Hombach, J. *et al.* (2005) Report on a WHO consultation on immunological endpoints for evaluation of new Japanese encephalitis vaccines, WHO, Geneva, 2–3 September, 2004. *Vaccine* 23(45), 5205-5211.

McArthur, M.A. & Holbrook, M.R. (2011) Japanese encephalitis vaccines. *J. Bioterr. Biodef.* 1, 1-16.

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 PLLAV delivery protocol in rhesus macaques
2	Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques
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'. 50200
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Biomedical Primate Research Centre
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques |
- 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.

For the preclinical vaccine evaluation studies using Plasmid-Launched Live-Attenuated Vaccine (PLLAV) technology-based vaccines in rhesus macaques we will first develop the intradermal immunization protocol for PLLAVs. The quality of the immune responses induced by the PLLAVs not only depends on the intrinsic properties of the vaccine vector constructs, like live-attenuated virus replication and protein expression, but also on the immunization procedure that most efficiently targets the dermis and that will lead to optimal replication of live-attenuated viruses that are launched from the PLLAV.

The PLLAVs will be administered to the macaques via intradermal application. When conventional DNA vaccines are used and applied to the skin, vaccine expression products are taken up by skin dendritic cells, processed, and presented to T-cells in the draining lymphoid organs. In contrast, when a PLLAV-based vaccine is injected in the skin, live-attenuated viruses (LAVs) are first produced that have the ability to transiently replicate in the body. Subsequently, the LAVs disseminate through the body, and stimulate the immune system much like wild-type pathogens do.

The primary parameter that will be evaluated is the detection and quantification of replication of the live-attenuated viruses after immunization with PLLAV- YFVax constructs.

After immunization with PLLAV-YFVax constructs, skin biopsies will be taken at different time points post-immunization, and the LAV replication will be quantified. The immunization protocol that most efficiently targets the dermis and leads to optimal replication of LAVs launched from the DNA construct will be selected for use in the PLLAV immunogenicity/efficacy studies.

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

The first phase of the project is dedicated to the targeting of PLAVVs to the skin, and to improve the delivery of the plasmid-launched live-attenuated viruses. The PLLAV immunization protocol will be developed in 3 successive studies. First, different application methods will be tested using a standard dose of DNA. The method that gives the highest LAV expression will next be used to determine the optimal dose of DNA. Finally, using the optimal application method and DNA dosage, we will evaluate the use of a carrier molecule for improved DNA expression.

The animals will be inoculated with the PLLAV-YFVax construct, or with constructs that express reporter proteins, like NanoLuciferase or mCherry. After inoculation, skin biopsies will be taken from the site of inoculation to quantify the level of expression of the vaccine virus. When PLLAV-reporter protein constructs are used, the level of reporter gene expression will be measured by PCR. The signal of NanoLuc in skin tissue homogenates will be used to quantify the vaccination efficiency and replication competence of the live-attenuated virus. The tissue distribution of the mCherry reporter protein in fixed tissue sections will be used to determine which tissue compartments and cells are targeted by this immunization method using fluorescence microscopy. After the biopsies have been taken, the wound will be stitched and pain relief will be given. To investigate the kinetics of the vaccine-induced immune responses in combination with the strength of that response, biopsies will be taken at different time points post-immunization to monitor LAV expression, replication, and reporter protein expression in different skin tissue compartments and cell types in time.

In between each sequential study, a go-no go decision point is planned. The criterion to continue with a next study, is that both skin biopsies taken from each individual animal are positive in one of the assays used to detect the LAVs. The PLAVV administration condition to be used in the next study will be selected on basis of the best average replication and expression, in combination the lowest standard deviation of the data. At the end of the study, the animals will be euthanized and a set of tissues (draining lymph nodes, liver, brain, etc.) will be collected to investigate the spread of the PLAVV beyond the site of inoculation. The immunization protocol that combines the targeting to the dermis with the highest level of LAV expression will be selected for the second part of the study in which we will evaluate the efficacy of PLAVVs in rhesus macaques (Appendix 2). The length of each PLLAV expression study is expected to be maximally 2 weeks.

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

Because of the explorative nature of the project no statistical support for the number of animals can be provided. In this first phase of the project we will optimize the immunization protocol using different PLLAV-constructs. The studies will give us first insight in the expression of PLLAV-YFVax constructs in the skin.

The institute has a proven track record for performing vaccination evaluation studies in nonhuman primates. Based on years of experience the number of animals needed for the first studies is estimated, and will be adjusted when necessary. The details of each study, including the exact number of animals that will be used, will be submitted to the AWB.

B. The animals

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

Rhesus macaques (*Macaca mulatta*), adult, m/f, n = 18, purpose bred at the institute, or at another registered breeder or supplier within the EU, in compliance with EU legislation.

The PLAVV-YFVax technology in combination with intradermal application has already shown its potential in rodents. However, findings in small animal models are not necessarily predictive for the outcome of similar studies in humans. The rodent immune system is evolutionary quite divergent from the human system, and as a result the vaccine-induced immune responses in rodents have only a limited predictive value for the vaccine-effectiveness in humans [1-4]. In addition, the rodent skin is much thinner than that of humans and this can significantly influence the intradermal administration and expression of the DNA vaccines [5,6]. For these reasons, PLAVV-YFVax needs to be tested in an animal model, 1) whose immune system is highly comparable to that of humans, and 2) whose skin tissue architecture is comparable to the human skin. The rhesus macaque animal model fulfills these two conditions [1-6] and is therefore selected for the preclinical evaluation of this technology.

In a small-scale study using the PLLAV technology in macaques, 1 out of 4 macaques showed a robust

immune response to the vaccine, providing a clear proof-of-concept for the PLLAV technology in macaques. Though encouraging, this also emphasizes the need for further improvement of the immunization protocol as only 25% of the animals elicited a substantial immune response.

In this project, a study is planned in which we will systematically investigate several vaccine delivery methods, different dosages of DNA, and the use of carrier molecules, in order to develop an optimal PLLAV immunization protocol.

First, we intend to evaluate 4 different application methods, using a standard dose of DNA, and 2 different PLLAV constructs. All will be performed in duplicate. Thus 4 methods x 1 DNA x 2 constructs x 2 = 16 immunizations per animal. We calculate that three animals are minimally needed for this part of the study. Three animals will allow us insight in the variance between the individual animals, and will allow us to identify possible outliers.

From this study, a delivery method will be selected and used for the evaluation of 4 different DNA dosages, using 2 PLLAVs. All immunizations will be performed in duplicate resulting in 1 x 4 x 2 x 2 = 16 immunizations per animal. Again, 3 animals are the minimum number to be used in order to cover between animal variability and to exclude outliers.

Third, the influence of carrier molecules on the immunization procedure will be investigated. Using the selected delivery method and a selected DNA dosage, the use of a carrier molecule to improve PLLAV expression will be evaluated in 3 animals.

We anticipate that for the development of the PLLAV delivery protocol minimally 9 animals will be needed. However, because of the highly exploratory nature of the studies with uncertain outcome, 18 animals are calculated for this phase of the project.

References

1. Bolker, J. (2012). Model organisms: There's more to life than rats and flies. *Nature*, 491(7422), 31-33.
2. Louz, D., Bergmans, H. E., Loos, B. P., & Hoeben, R. C. (2013). Animal models in virus research: their utility and limitations. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), 325-361.
3. Smith, D. R., Holbrook, M. R., & Gowen, B. B. (2014). Animal models of viral hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 112(C), 59-79.
4. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 4(12), 62-82.
5. Avci, P., et al. (2013) Animal models of skin disease for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.*, 8(3): 331-355.
6. Jung, E.C. and Maibach, H.I. (2014) Animal models for Percutaneous Absorption. In: *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration*. p21-30.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

The animals that will be used in the experiments may have been used in previous, unrelated studies. Animals that have been used previously in other flavivirus studies are not suitable for re-use because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. Given the long life expectancy of this species, the animals may be re-used within the legal framework as described in art. 1e of the Law on Animal Experimentation (Wet op de Dierproeven).

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

X 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

With today's state of scientific knowledge, vaccines for human use can still only be developed using animal studies. Recent studies in rodent models have demonstrated the potency of the PLAVV-YFVax technology to induce protection against the yellow fever virus infection. However, because the immune system of rodents is evolutionarily distant from that of humans, these findings have only a limited predictive value for the effectiveness of vaccine-induced immune responses in humans [1-4]. Thus, the predictive value of rodents for the efficacy of DNA vaccines for human use is limited.

The main objective of this project is to develop the PLAVV-YFVax technology, and to ready this technology for pre-clinical development. *In vitro* expression studies, and studies in rodents will play an important role in the early steps of the PLAVV-YFVax development. These studies will be used to assess the potential of novel constructs to produce LAVs, to test their immunogenicity, and to determine the safety in rodent models. But the nonhuman primate animal model, with its immunological and physiological similarities to humans, is most suitable preclinical model for evaluating the effectiveness and safety of this novel vaccine platform. In addition to the abovementioned similarities between NHP and humans, the use of different strategies to immunize animals in the skin requires an animal model with a skin architecture much like that of humans. NHP also fulfill this requirement [5,6].

Reduction

This animal procedure involves the development of a protocol for intradermal injection of PLAVV in the skin of macaques. A small-scale study in macaques already provided proof-of-concept for the PLLAV technology in macaques. Because of the explorative nature of the study no statistical support for the number of animals can be provided. Everything will be done to keep the number of animals that will be used in this phase of the project as low as possible. Each study will be performed in a step-wise design, starting with two animals per parameter. Only when no sufficient results are obtained, extra animals will be used in a second study after approval of the institutional Animal Welfare Body.

Refinement

Immunization will be performed without a needle using needle-free injection methods. Needle-free injection methods are virtually painless and will reduce the risk of trauma because the immunization causes less damage to the tissue. Biopsies will be taken under anesthesia. After skin biopsies are taken, the wounds will be stitched, and analgesia will be administered. The animals are trained to work voluntarily as possible to invasive biotechnical actions such as giving of an anesthetic, or immunization. All observations will be documented and registered in a digital database at the institute. For the experiments, the standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of vaccine-related side-effects.

1. Bolker, J. (2012). Model organisms: There's more to life than rats and flies. *Nature*, 491(7422), 31-33.
2. Louz, D., Bergmans, H. E., Loos, B. P., & Hoeben, R. C. (2013). Animal models in virus research: their utility and limitations. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), 325-361.
3. Smith, D. R., Holbrook, M. R., & Gowen, B. B. (2014). Animal models of viral hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 112(C), 59-79.
4. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 4(12), 62-82.
5. Adam, I., Rosenbaum, P., Cosma, A., Le Grand, R., & Martinon, F. (2015) Identification of skin immune cells in non-human primates. *Journal of Immunological Methods*, 426, 42-49.
6. DeMuth, P.C. *et al.* (2013). Vaccine delivery with microneedle skin patches in nonhuman primates. *Nat Biotechnol.*, 31(12), 1082-1085.

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

The animals will be socially housed with compatible partners to avoid stress of solitary housing. To ensure that the animals can behave themselves as naturally as possible, the institute has an extensive program for enrichment.

Immunizations and blood collections will be performed under sedation. Where necessary, the animals will be given analgesia. If possible, the animals will be trained to voluntary cooperate with the necessary anesthesia. During the experiment, the animals are monitored daily by experienced animal caretakers, and at each sedation time-point the animals will be examined. If there are changes in behavior, appetite, or there is a change of stool, then the veterinarian will be informed, accordingly. Equally, our institute

uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations made during the studies by the trained animal caretakers, like changes in behaviour, appetite and stool, are documented in this database. The use of the database facilitates early recognition of minor changes in these general health parameters, allowing intervention measures taken at an earliest time-point.

Should an animal become seriously ill during the study, then at the same day the animal will be euthanized and necropsy will be performed ("humane endpoint"). When animals are daily sedated for skin biopsies, supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage). This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Thus, the wellbeing of the animals is not additionally affected.

The studies will be performed according to Dutch laws, and the experiments will not cause adverse effects on the environment.

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.

It is expected that skin biopsies will cause pain. The biopsies will therefore be

performed under anaesthesia, and analgesics will be applied peri-operatively.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort and stress due to recovery from anesthesia.
2. Reduced food intake due to daily sedation
3. Discomfort due to immunizations with PLLAVs.
4. Discomfort due to pain caused by skin biopsies.

Explain why these effects may emerge.

1. Administration of anaesthesia can cause local irritation, and nausea and disorientation can sometimes be observed during recovery from the sedation.
2. When animals are daily sedated, this will have influence of the appetite
3. Immunizations can cause local irritation
4. Skin biopsies cause moderate pain

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

1. If local irritation occurs the severity will be minor, and no extra measures are needed. The recovery from sedation of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
2. Animals will receive tube feeding via gavage.
3. If local irritation occurs due to the immunisations, severity is expected to be minor. Therefore, no extra measures are needed. The site of immunization will be examined each time an animal is sedated. If unexpectedly adverse effects occur, the veterinarian will be informed. The veterinarian will decide to treatment the animal, or, in case of severe illness, if a humane endpoint is reached.
4. Discomfort caused by skin biopsies (< 1 cm) will be moderate. The biopsies will be taken under anaesthesia, and analgesics will be applied peri-operatively.

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.

X Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

During the study, the animals are monitored twice daily for changes in general behaviour. When sedated, the animals are examined for local adverse effects. If an animal is seriously ill, the veterinarian will be informed. If the animals cannot be treated, this will be seen as a humane endpoint and the animal will be euthanized

Indicate the likely incidence.

The chance that an individual animal will reach a human endpoint due to the PLLAV is very low (<1%), based on studies in rodents

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').

Skin biopsies will cause pain, expected less than 24 hr. This will cause moderate discomfort. All other procedures (immunizations, sedations) will cause minor discomfort. Severe discomfort is avoided by implementation of a humane endpoint.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

X Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

In order to examine the spread of the live-attenuated vaccine virus early after infection, it is necessary to collect tissue/organs samples (draining lymph nodes, liver, brain, etc.) for further analysis.

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.

X 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'.	50200	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Biomedical Primate Research Centre	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques

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.

Analogous to the immunization protocols described for commercially available live-attenuated YFV, JEV and rabies virus (RABV) vaccines, and used in the PLLAV-YFVax studies in hamsters, the set-up of the studies will typically consist of a single immunization followed by a monitoring period in which the development of specific immune responses is monitored. During the follow-up, blood samples will be collected and tested for vaccine-induced humoral and cellular immune responses, as well as the influence of vaccination on the innate immunity.

The first planned study is intended to show the non-inferiority of PLLAV-YFVax against a well-characterized commercially available yellow fever vaccine, Stamaril[®], and to confirm that the majority of animals elicit such responses. Stamaril[®] is specifically used in this study as control-comparator because the YFV genome that is used in the PLLAV is derived from this vaccine. In this important step in the validation of the PLLAV technology, the neutralizing antibody titers against YFV will be the prime read-out, and will be compared to antibody titers induced in macaques using Stamaril[®]. Only if they are equivalent to, or exceed those induced using Stamaril[®], we will continue with the next phase of the project, the evaluation of dual-target vaccines. Importantly, because the immune correlates of protection for YFV are known, this study only consists of an immunization follow-up phase without the need of an experimental YFV infection to control for protection.

Next, the potential of the PLLAV technology for the production of dual-target vaccines will be assessed using PLLAV-YFVax-RABV and PLLAV-JEVax-RABV. Also for these vaccines, neutralizing antibody responses elicited by the vaccine will be decisive for the success of the vaccines.

If the neutralizing antibody titers are equivalent to, or exceed the known immune correlates of protection, the animals from both studies will be euthanized, and blood and organs will be collected to investigate for residual vaccine virus and evaluation of vaccine-induced tissue damage. If titers are lower

than the correlates of protection, the animals will receive a second immunization followed by an extra follow-up period. At the end of the study, the animals will be euthanized, and blood and organs will be investigated.

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

Typically, a PLLAV evaluation study will consist of a single administration followed by a 6-weeks follow-up period. Control group animals will receive commercially available RABV, JEV and YFV vaccines administered by standard vaccination techniques, according to the manufacturer's recommendations. The PLLAVs will be given intradermally. The immunization method will be selected on basis of results obtained from the studies described in Appendix 1. For the analysis of the vaccine-induced immune responses, blood samples will be collected pre-vaccination and at regular time-points post-immunization during the follow-up period to monitor the replication of the vaccine construct, to measure clinical chemistry and hematology, and to measure the vaccine-induced B- and T-cell immunity. The animals will be monitored daily during the study period for general behaviour, appetite, faeces, etc., and at each time-point when the animals are sedated, body weight and body temperature will be measured. Also, the sites of immunization are checked for adverse effects due to the injection procedure used. Cell-mediated immunity and innate immune responses will be evaluated by FACS analysis and by Luminex. IgG and IgM production will be measured using ELISA, and the development of neutralising antibody titers will be measured using virus-inhibition assays. The animals will be euthanised at end of the study. Necropsy will be performed and tissue samples will be collected to determine the presence or absence of the vaccine virus after clearance of viremia. Neutralizing antibody responses elicited by the novel vaccines (generally at four to five weeks post-immunization) will be decisive for the success of the vaccine, and will provide a go-no go criterion. If the neutralizing antibody titers are equivalent to, or exceed the known immune correlates of protection, the animals will be euthanized. Blood and organ specimen will then be collected to investigate for residual vaccine virus, and for the evaluation of vaccine-induced tissue damage. If the threshold for protective immune responses is not met at 4-5 weeks post-immunization, the animals may be given a booster immunization. Then, the animals are monitored for another 6 weeks, exactly as is done after the first immunization. At the end of the monitoring, the animals will be euthanized and blood and organs investigated.

The details of each study, regarding the interval between the immunizations, the number and time points of sampling will depend on the actual type of vaccine that is being tested and details will be submitted to the AWB.

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

The number of animals will be based on statistical power analysis. Calculations take into account the number of animals needed to measure whether significant differences between the experimental and commercial vaccine groups can be obtained. Care will be taken that only the minimum number of animals that is needed will be used.

The primary outcome measure will be the induction of neutralizing antibody titers (defined as an antibody level exceeding the established protective level for each virus under investigation). This will be analyzed using (non-parametric) 2 x 2 contingency tables and a one-sided Fisher's exact test.

The exploratory outcome measures include:

- The levels of neutralizing antibody titers induced following vaccination.
- The occurrence of adverse reactions following vaccination. These data will be presented as descriptive statistics.

B. The animals

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

Rhesus macaques (*Macaca mulatta*), adult, m/f, n =120, purpose-bred at the institute, or obtained from another registered breeder or supplier within the EU, in compliance with EU legislation.

Rhesus macaques have been extensively used in YFV, JEV and RABV vaccine research and, importantly, the immune correlates of protection in this nonhuman primate species are well known, and adopted by the WHO and FDA as criteria for vaccine efficacy in humans (see section A). Therefore, the rhesus

macaque is the preferred species for use in this project. The number of animals to be used for each study will be based on results of other studies performed at the institute. If possible, power calculation specific for the experiment will be made to determine the group sizes.

In all, we anticipate to carry out 6 studies using different PLLAVs over a 5-year period, including the first planned study, intended to show the non-inferiority of PLLAV-YFVax against the Stamaril® yellow fever vaccine. Based on the assumption that each study will contain a PLLAV group and a control group, with a maximum of 10 animals per group, the estimated maximum number of animals requested for this phase of the project is 120.

The exact study design will be submitted to the AWB.

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.

The animals that will be used in the experiments may have been used in previous, unrelated studies. Animals that have been used previously in other flavivirus or rabies virus studies are not suitable for re-use because of the strong immunological cross-reactivity between the different viruses. Given the long life expectancy of this species, the animals may be re-used within the legal framework as described in art. 1e of the Law on Animal Experimentation (Wet op de Dierproeven).

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

With today's state of scientific knowledge, vaccines intended for use in humans can still only be developed using animal studies. Recent studies in rodent models have demonstrated the potency of the PLLAV-YFVax -technology to induce protection against the yellow fever virus infection. However, because the immune system of rodents is evolutionarily distant from that of humans, these findings have only a limited predictive value for the effectiveness of vaccine-induced immune responses in humans [1-4]. The main objective of this project is to develop the PLLAV-YFVax technology for the production of vaccines, and to ready this technology for pre-clinical development. Rodent models will play an important role in the early steps of the PLLAV-YFVax development, but the nonhuman primate animal model, with its immunological and physiological similarities to humans, is the most suitable preclinical model for evaluating the effectiveness and safety of this novel vaccine platform

Reduction

Statistical calculations for the number of animals per vaccine group will be based on the results of published studies in macaques using commercial vaccines for YFV, JEV, and RABV. This power analysis will give the minimum number of animals required for a statistically valid experimental design. Furthermore, we aim to evaluate different vaccine candidates in a single experiment, so that a single control group can be used and the number of animals needed can be reduced significantly.

Refinement

In case of YFV, JEV, and RABV vaccines, the immune correlates of protection in macaques are known. This makes an experimental infection with these viruses after immunization superfluous, and thus, viral challenge is not a part of the studies. This significantly reduces the discomfort caused to the animals by the experimental procedures.

Immunization will preferentially be performed without a needle using needle-free methods. These methods are virtually painless and may reduce trauma because the immunization causes less damage to the tissue. The immunizations and blood collections will be performed under sedation, and at the same time body temperature and body weight will be measured. The animals are trained to comply voluntarily

as much as possible with invasive biotechnical procedures such as giving of an anesthetic or immunization.

During the study, the animals will be monitored daily by experienced animal caretakers, and at each sedation time-point the animals will be examined. Changes in behavior, appetite, appearance etc. will be documented. These, including changes in blood parameters, will be used to prepare a clinical score list for use in future PLLAV-related studies.

If an animal shows behavioral changes, weight loss, or illness it will be decided in consultation with the veterinarian whether treatment is needed. In case of severe illness, an animal it will be taken directly off the protocol and will be euthanized to prevent further distress.

1. Bolker, J. (2012). Model organisms: There's more to life than rats and flies. *Nature*, 491(7422), 31-33.
2. Louz, D., Bergmans, H. E., Loos, B. P., & Hoeben, R. C. (2013). Animal models in virus research: their utility and limitations. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), 325-361.
3. Smith, D. R., Holbrook, M. R., & Gowen, B. B. (2014). Animal models of viral hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 112(C), 59-79.
4. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 4(12), 62-82.

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

The animals will be socially housed with a compatible partner to avoid stress of solitary housing. To ensure that the animals can behave as naturally as possible, the institute has an extensive program for enrichment (<http://www.bprc.nl/en/welfare/>).

During the study, the animals are monitored daily by experienced animal caretakers, and at each sedation time-point the animals will be examined. If there are changes in behavior, appetite, or there is a change of stool, then the veterinarian will be informed, accordingly. Should an animal become seriously ill during the study this is considered a humane endpoint. The animal will then be euthanized the same day and necropsy will be performed.

The studies will be performed according to Dutch laws, and it is not expected that the experiments will have adverse effects on the environment.

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?

1. Discomfort due to administration of vaccines
2. In humans, the commercially available live-attenuated vaccines for YFV and JEV often cause discomfort like fever, headache, muscle pains, nausea and local irritation. In addition, the commercially available rabies vaccine, Rabipur, also causes lymphadenopathy, dizziness, and skin reactions. No data are available related to similar side effects in macaques, but given the relatedness between humans and monkeys, the latter may also suffer from these vaccine-related side effects.
3. Stress because of sedation and recovery.

Explain why these effects may emerge.

1. Administrations can cause local irritation
2. Replication of live-attenuated vaccine viruses is necessary for an optimal immune response. However, LAVs are not fully harmless and can thus induce mild disease symptoms
3. Animals will be repeatedly sedated for vaccine delivery and blood sampling. Nausea and disorientation can sometimes be observed during recovery from the sedation.

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

1. If local irritation occurs the severity will be minor. Therefore, no extra actions are needed.
2. During the study the animals will be monitored daily by experienced animal caretakers, and at each sedation time-point the animals will be examined. If there are changes in behavior, appetite, or there is a change of stool, then the veterinarian will be informed, accordingly. If side effects occur, they will cause limited discomfort for a limited period of time. However, should an animal become seriously ill during the study, then at the same day the animal will be euthanized to prevent severe discomfort.
3. Animals will recover in their home cage, separated from the cage mate. Recovery and reintroduction of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.

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.

Because serious side effects due to YFV, JEV or RABV live-attenuated vaccines have not been described in macaques, it is not possible to provide clear criteria to define a humane endpoint. However, through intensive monitoring of the animals after immunization deviations in behaviour, appetite, etc. will be

noticed quickly. In addition, the animals are weighed at each blood sampling. A large weight loss of > 20% relative to the weight at the start of the study can be considered a humane endpoint. If changes in behavior are noticed, or a large weight loss is monitored, the veterinarian will be consulted. The veterinarian will decide if the animal has reached a humane endpoint and needs to be euthanized.

Indicate the likely incidence.

All animals will be immunized with a live-attenuated vaccine, either one of the commercially available vaccines, or those launched from the new PLLAV platform. However, the risk that an animal reaches the criteria for a humane endpoint is very low (< 1%).

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').

The cumulative discomfort will be minor.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

X Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

In order to investigate the presence of residual vaccine virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage due to the vaccine virus, it is necessary to euthanize the animals. This may not be the case in all experiments. If sufficient data are obtained, the animals from subsequent studies need not to be euthanized and can be re-used in other experiments after the vaccine virus has been cleared. The latter decision will be communicated and discussed with the AWB.

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.

X Yes

**6**

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre

10.2.e

Postbus 3306

2288 GJ RIJSWIJK

10.2.g

**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

AVD5020020171326

Bijlagen

2

Datum 11 januari 2018

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.g

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 6 november 2017. Het gaat om uw project "Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020171326. 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

Datum:

11 januari 2018

Aanvraagnummer:

AVD5020020171326

Datum:
11 januari 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020171326

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50200
Naam instelling of organisatie: Biomedical Primate Research Centre
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 10.2.e
Straat en huisnummer: Lange Kleiweg 161
Postbus: 3306
Postcode en plaats: 2288 GJ RIJSWIJK

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 10.2.e
Functie: 10.2.g
Afdeling: 10.2.g
Telefoonnummer: 010.2.e
E-mailadres: 10.2.g

Datum:
11 januari 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020171326

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 10.2.e
Functie: 10.2.g
Afdeling: 10.2.g
Telefoonnummer: 10.2.g
E-mailadres: 10.2.e

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 januari 2018
Geplande einddatum: 31 december 2022
Titel project: Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines
Titel niet-technische samenvatting: Evaluatie van een nieuwe vaccinproductietechnologie voor de ontwikkeling van volgende generatie rabiës-flavivirus-combinatievaccins
Naam DEC: 10.2.g
Postadres DEC: 10.2.g
E-mailadres DEC: 10.2.e

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
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: 10.2.e
Functie: 10.2.g
Plaats: Rijswijk
Datum: 3 november 2017

Datum:
11 januari 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020171326



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre

10.2.e

Postbus 3306

2288 GJ RIJSWIJK

10.2.g

**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
AVD5020020171326

Bijlagen

2

Datum 11 januari 2018

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 11 januari 2018

Vervaldatum: 10 februari 2018

Factuurnummer: 171326

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5020020171326	€ 1.287,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD502000020171326
2. Titel van het project: Evaluation of a novel vaccine production technology in rhesus macaques.
3. Titel van de NTS: Evaluatie van een nieuwe vaccinproductietechnologie in resusapen
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: 10.2.g
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e
 - e-mailadres contactpersoon: [redacted]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 07-04-2017, 18-09-2017, 27-10-2017
 - aanvraag compleet: 07-04-2017
 - in vergadering besproken: 12-04-2017 en 18-10-2017
 - anderszins behandeld: 30-10-2017 tot 01-11-2017 via email correspondentie tussen DEC leden
 - termijnonderbreking(en): van 13-04-2017 tot 18-09-2017 en 23-10-2017 tot 27-10-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 18-09-2017 en 27-10-2017
 - advies aan CCD: 06-11-2017
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend bij de DEC.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager
- Datum: 13-04-2017 en 23-10-2017.
 - Gestelde vraag/vragen: Enige tekstuele aanpassingen, nadere toelichting omtrent hoofddoelstelling, de te gebruiken vaccin technologie, fasering van de studies in bijlage 1, nadere onderbouwing van het benodigde aantal dieren. Tevens werd gevraagd om aanvullende informatie over biotechnische handelingen en humane eindpunten. Na aanpassing van de tekst werd bij een tweede bespreking verdere uitleg gevraagd over het aantal benodigde dieren per test groep in bijlage 1 en de go/no go momenten voor studies beschreven in bijlage 1 en 2.
 - Datum antwoord: 18-09-2017 en 27-10-2017.
 - Verstrek(e) antwoord(en): Het projectvoorstel is aangepast in het format projectvoorstel (nadere toelichting hoofddoelstelling en beschrijving vaccin platform), de NTS (beschrijving doelstelling project, opbrengsten), bijlage 1 (fasering studies, benodigde aantal dieren) en bijlage 2 (aanpassing in biotechnische handelingen). Naar aanleiding van de vragen bij de tweede bespreking is in bijlage 1 het aantal benodigde dieren aangepast waardoor de variatie tussen de dieren beter bepaald kan worden en een betere selectie van de optimale toedieningsmethode kan plaats vinden. Tevens zijn in bijlage 1 en bijlage 2 de go/no go momenten nader gespecificeerd.
 - De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen statistische analyse, de immunologie, virologie, vaccin onderzoek, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op gebied van ontwerp van dierproeven, proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, ethiek en proefdieren en hun bescherming. De DEC heeft ruime ervaring met het beoordelen van vaccin onderzoek in niet-humane primaten.
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.
Een van de DEC leden was betrokken bij de aanvraag. Deze persoon heeft zich teruggetrokken van de vergadering bij de bespreking van de aanvraag en overigens geen aandeel gehad in de afweging en advisering.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. In dit project wordt een nieuw vaccin platform, namelijk "Plasmid-Launched Live-Attenuated Vaccine (PLLAV)" geëvalueerd op het vermogen om een beschermende immuun respons in niet-humane

primaten te induceren. Het voorgestelde onderzoek bestaat uit drie fasen, te weten 1) optimaliseren van de toedieningswijze voor dit vaccin platform, 2) validatie van de PLLAV technologie door vergelijking met een commercieel vaccin dat reeds gebruikt wordt tegen gele koorts en 3) bepalen van de effectiviteit van nieuwe PLLAV combinatievaccins tegen rabiës samen met gele koorts of rabiës samen met Japans encefalitis. Het te gebruiken diermodel voor het uitvoeren van fase 1 is beschreven in bijlage 1. Het te gebruiken diermodel voor fase 2 en 3 is beschreven in bijlage 2. De subdoelen sluiten logisch aan bij het hoofddoel en vormen met elkaar een samenhangend geheel. Na eerst de toedieningswijze van het vaccin geoptimaliseerd te hebben wordt dit vervolgens vergeleken met een bestaand vaccin en daarna worden de mogelijkheden geëxploreerd voor een bredere toepassing als combinatie vaccin tegen twee verschillende pathogenen. De handelingen die de dieren zullen ondergaan en het verwachte ongerief zijn duidelijk omschreven en de uitkomsten uit dit experiment zijn helder en meetbaar. Het aantal dieren dat gebruikt zal worden is realistisch ingeschat en voor zover mogelijk statistisch onderbouwd. De klinische eindpunten zijn duidelijk gedefinieerd.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelestellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorie, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek', sluit aan bij het projectvoorstel. In deze projectaanvraag wordt een nieuw vaccin platform getest in resus makaken op veiligheid en het vermogen om een beschermende immuun respons op te wekken tegen rabiës, gele koorts en Japans encefalitis. Tevens wordt aangetoond of combinatie vaccins op PLLAV basis effectief en efficiënt kunnen zijn, hetgeen naast de translationele toepassing ook van wetenschappelijk belang is. Het immuunsysteem van resus apen vertoont belangrijke overeenkomsten met dat van de mens, waardoor de uitkomsten een goede indicatie geven over mogelijke bijwerkingen en immunogeniciteit in de mens. Bovendien vormen de in humane primaten opgewekte immuun responsen door de WHO en de FDA erkende criteria voor vaccin effectiviteit bij de mens.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Het directe doel van het project is om de effectiviteit van nieuwe combinatievaccins tegen rabiës /gele koorts ofwel rabiës/Japans encefalitis te testen op veiligheid en effectiviteit in resus apen. De ontwikkeling van een goed en goedkoop vaccin tegen rabiës heeft de hoogste prioriteit in dit project. Het aantal rabiës gevallen wordt zwaar onderschat door gebrek aan rapportage, men denkt dat de 58.000 dodelijke slachtoffers die jaarlijks gerapporteerd worden slechts 3% van het werkelijke aantal slachtoffers is. Nieuwe vaccins tegen gele koorts en Japans encefalitis zijn dringend nodig omdat de huidige vaccins (op basis van verzwakt virus), hoewel redelijk effectief, inherente problemen hebben. Ten eerste is het productieproces niet goed op te schalen, waardoor de levering achter blijft bij de vraag. Ten tweede moeten de vaccins koud bewaard blijven tijdens het transport, wat in landen met een minder goed wegennet vrijwel onmogelijk is. De te testen combinatievaccins zijn goedkoop, makkelijk te produceren en hoeven niet koud te blijven tijdens transport. Het vaccin platform dat gebruikt wordt in deze aanvraag is niet alleen toepasbaar voor vaccins tegen rabiës, gele koorts en Japans encefalitis, maar kan ook gebruikt worden voor vaccins tegen diverse andere pathogenen. Daarenboven wordt met deze strategie met 1 vaccin bescherming tegen twee verschillende pathogenen bereikt. Vaccins die getest gaan worden in dit model zijn innovatief en kunnen niet in een andere diersoort worden getest omdat die modellen niet voorspellend zijn voor

werking van deze vaccins in de mens.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*) De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van nieuwe vaccins tegen rabiës, gele koorts en Japans encefalitis zijn te beschermen personen, de proefdieren en het onderzoeksveld.

Het belang voor de samenleving is dat het aantal dodelijke slachtoffers en zieken door rabiës, gele koorts en Japans encefalitis wordt teruggedrongen. Goedkope en betrouwbare vaccins zijn daarvoor essentieel. Dergelijke vaccins die bovendien niet koud bewaard hoeven te worden zijn met name in landen met minder goede voorzieningen of weinig financiële middelen van groot belang voor verbeteren van de volksgezondheid. Verbetering van de gezondheid zal ook leiden tot sociaal maatschappelijke en financieel economische voordelen.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen stress ondervinden, kunnen ziek worden en soms enige mate van pijn ondervinden. De dieren zullen worden gedood in het kader van de proef.

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s). Dit onderzoek kan leiden tot meer inzicht in de immunogeniciteit van vaccins gebaseerd op het PLLAV platform en over welke toedieningswijze het meest geschikt is voor dit soort vaccins.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken? Er zijn geen substantiële milieueffecten te verwachten binnen de kaders of ten gevolge van dit project.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. Dit onderzoek zal worden uitgevoerd binnen een internationaal consortium in het kader van een door de EU gehonoreerd project. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven blijkt uit de jarenlange ervaring met het uitvoeren van vaccin onderzoek in makaken en de aandacht voor toepassing van vermindering en verfijning bij de dierproeven.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. Belangrijke voorafgaande studies zijn reeds gedaan in knaagdiermodellen. De gekozen aanpak bestaat uit 1) optimaliseren van de toedieningswijze, 2) gebruik van de beste toedieningswijze voor de evaluatie van het nieuwe vaccin platform tegen een van de huidige vaccins, 3) verdere evaluatie van het vaccin platform voor geschiktheid als combinatie vaccin tegen twee pathogenen. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor

voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

Het experiment wordt uitgevoerd met niet-humane primaten, namelijk de resus aap (*Macaca mulatta*). De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de nauwe overeenkomsten tussen het immuunsysteem van de resusaap en de mens, inclusief de typen afweercellen in de huid. Eerdere experimenten hebben aangetoond dat de sterkte van de door vaccinatie opgewekte immunologische responsen tegen de hier te testen virussen voorspellend zijn voor de beschermende werking van het vaccin in mensen. Het is daarvoor belangrijk dat het immuunsysteem van de diersoort waarin het vaccin getest wordt zo veel mogelijk overeenkomt met dat van de mens.

Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt, mits de voorafgaande experimenten niet kunnen interfereren met de huidige proefuitkomsten. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De huisvesting en verzorging voldoen ten volle aan de vereisten in bijlage III.
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief is op basis van ervaring met voorgaande vaccin studies correct als matig ingeschat voor de experimenten beschreven in bijlage 1 en licht voor de experimenten beschreven in bijlage 2 en zal worden veroorzaakt door de vaccinaties en de huidbiopten en een beperkt aantal bloedafnames die van een aantal dieren zullen worden afgenomen. De dieren die gebruikt zullen worden voor de experimenten zijn speciaal voor dit doel gefokt, en zullen als sociaal compatibel duo worden gehuisvest.
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de toediening van teststof en herhaalde sedatie. Bij de dieren waarin het vaccinatieprotocol wordt getest wordt meerdere keren een huidbiopt genomen. Dit zal niet leiden tot blijvend letsel. De dieren worden aan het einde van de studie geëuthanaseerd om te kijken naar aanwezigheid van het vaccin-virus in inwendige organen. Dieren die gebruikt worden om de effectiviteit van het vaccin te testen zullen aan het einde van het experiment worden geëuthanaseerd om te kijken naar aanwezigheid van vaccin-virussen in inwendige organen en eventuele schade aan de organen. Indien gedurende de loop van het project reeds voldoende informatie omtrent verspreiding van het virus en veiligheid zijn verkregen zal euthanasie niet meer nodig zijn en zullen de dieren terug keren naar de

oorspronkelijke toestand, qua gezondheid en welzijn. Dit zal worden afgestemd met de IvD.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe. Humane eindpunten zijn gebaseerd op het waarnemen van lokale veranderingen op de toedieningsplek, veranderingen in gedrag, eetlust en gewicht. Op basis van de literatuur zijn geen ernstige effecten van de vaccins te verwachten. Echter de dieren worden zorgvuldig geobserveerd en humane eindpunten worden toegepast om verder ongerief te voorkomen. Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de kans dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken adequaat ingeschat.
14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Er is geen *in vitro* model waarin de effectiviteit van vaccins kan worden getest, daarom is gebruik van proefdieren noodzakelijk. De toedieningswijze van het vaccin (via naaldvrije methoden) wordt geoptimaliseerd in apen omdat die qua huidstructuur en immuunsystemen het meest op de mens lijken. Hierdoor is de uitkomst van experimenten met humane vaccins in resusapen het meest voorspellend voor de werking in mensen.
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe. De proefopzet wordt telkens gebaseerd op de concrete experimentele vraagstelling. Het aantal te gebruiken dieren per behandelgroep wordt voor zover mogelijk bepaald met behulp van statische powerberekeningen op basis van de verwachte effect grootte van de primaire uitkomstparameter en spreiding van de data. Het aantal dieren dat nodig is voor het optimaliseren van de toedieningswijze is tot een minimum beperkt en wordt door de DEC geaccepteerd.
16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe. De uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren die goed aan mensen gewend zijn, de dieren zijn bovendien getraind om mee te werken aan bepaalde dier technische handelingen, waardoor ze minder stress ervaren. Sedatie en pijnbestrijding zal worden toegepast.
17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. N.v.t.
Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef
18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. In onderhavige projectaanvraag worden dieren van beide geslachten gebruikt.
19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. Bij de experimenten voor de optimalisatie van de toedieningswijze van het vaccin zullen de dieren

worden gedood om de hoeveelheid en de verdeling van het virus over het lichaam te bepalen. Van de dieren waarbij de effectiviteit van de nieuwe vaccins wordt bepaald wordt een deel gedood aan het einde van het experiment om aanwezigheid van virussen in inwendige organen en mogelijke schade aan de weefsels te bepalen. Daarnaast worden dieren ge-euthanaseerd wanneer humane eindpuntcriteria worden bereikt, dit om verder ongerief te voorkomen. Er wordt een passende dodingsmethode gebruikt (conform bijlage IV van de richtlijn).

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. Hergebruik wordt altijd overwogen en ook nagestreefd (binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke kwaliteit).

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? Naar de mening van de DEC beschrijft de niet-technische samenvatting het project inhoudelijk correct en in begrijpelijke taal.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het testen van innovatieve combinatievaccins tegen rabiës plus gele koorts of Japanse encefalitis het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren.
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

De waarden die voor de samenleving in het geding zijn zijn gelegen in het ontwikkelen van nieuwe goedkopere en makkelijker te distribueren combinatievaccins tegen hondsdolheid plus gele koorts of hondsdolheid plus Japans encefalitis. Naar verwachting leidt dit tot vermindering van het aantal ziektegevallen en doden als gevolg van infectie met bovenstaande virussen. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor de kwaliteit van leven van de mensen. Gezien de ernst van de ziektes en het aantal aangedane personen wordt het belang voor de samenleving als groot ingeschat. Het belang wordt verder ondersteund door het feit dat dit onderzoek door de EU wordt gefinancierd.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze kunnen hierdoor mogelijk ziek worden en enige pijn ondervinden door beperkte chirurgische ingrepen, bloedafnames en injecties. De dieren ondervinden hiervan licht tot matig nadeel.

De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de toepasbaarheid van vaccins gebaseerd op het PLLAV platform ter voorkoming van rabiës in combinatie met ofwel gele koorts of Japans encefalitis. Ook kunnen de resultaten leiden tot een beter begrip omtrent extrapolatie naar de mens. Daarmee is dit onderzoek innovatief, informatief en het is de uitdrukkelijke bedoeling om dit te publiceren. Gezien de mogelijkheden tot een bredere toepassing

van dit vaccin platform wordt het belang als groot ingeschat.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot de ontwikkeling van nieuwe vaccins die gemakkelijk gebruikt kunnen worden voor grootschalige bestrijding van hondsdolheid in mensen (en wellicht ook in honden), gele koorts en Japans encefalitis. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De DEC concludeert dat de belangen van de samenleving die worden nagestreefd in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.

Het onderzoek is van groot belang voor miljoenen mensen in verschillende delen van de wereld. Het aantal doden veroorzaakt door infectie met een van de drie virussen waar de vaccins tegen ontwikkeld worden kan met behulp van een vaccinatieprogramma gebaseerd op de nieuwe vaccins aanmerkelijk gereduceerd worden. Bovendien kan het hier te testen vaccin platform in de toekomst mogelijk ook worden toegepast voor bescherming tegen andere pathogenen.

De expertise voor het verrichten van deze experimenten is beschikbaar binnen de instelling en bij de betrokken onderzoekers. De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek naar vaccins tegen verschillende virussen. De vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten is ruimschoots aanwezig. Door de zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens zullen de uitkomsten van dit onderzoek een betrouwbare voorspelling geven voor de werking van het vaccin in mensen. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. De 3V-principes worden gehonoreerd door hergebruik van dieren, en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen (training onder beloning). Het ongerief is maximaal matig. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling is het noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid van de kandidaat vaccins te onderzoeken in een diemodel dat grote overeenkomsten vertoont met de mens. De effecten van de kandidaat vaccins kunnen in dit diemodel goed worden onderzocht en ook kunnen eventuele nadelige effecten aan het licht komen.

Gezien de grote voordelen van het beschikbaar komen van een goedkoop, breed toepasbaar en effectief combinatie vaccin platform tegen diverse ziekteverwekkers is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd

met de IVD.

- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus. De belanghebbende die lid is van de DEC heeft geen aandeel gehad in de totstandkoming van dit advies.
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.

10.2.e

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: maandag 29 januari 2018 13:22
Aan: 10.2.e
CC: 10.2.e
Onderwerp: Aanhouden AVD5020020171326

Categorieën: Dossier: 10.2.e

Geachte 10.2.e

Op 06-11-2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines" met aanvraagnummer AVD5020020171326. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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

- Het is in bijlage 3.4.4.1 onduidelijk hoe vaak een huidbiopt wordt genomen en hoeveel tijd tussen de verschillende biopten zit. Graag dit verhelderen.

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.

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.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Geachte mevrouw, heer,

Naar aanleiding van uw verzoek om aanvullende informatie betreffende onze aanvraag projectvergunning Dierproeven, AVD5020020171326, stuur ik u de gevraagde aanvullende informatie.

Uw vraag:

Het is in bijlage 3.4.4.1 onduidelijk hoe vaak een huidbiopt wordt genomen en hoeveel tijd tussen de verschillende biopten zit. Graag dit verhelderen.

Antwoord:

- Bijlage 3.4.4.1 (Appendix 1): per dier zullen maximaal op 4 tijdstippen 2 huidbiopten worden genomen van verschillende plaatsen op de rug. De tijd tussen de afname van verschillende huidbiopten zal minimaal 2 dagen zijn. De exacte tijdstippen, aantal en tijd tussen de afnames zullen per studie met de IvD worden besproken.

Ik hoop dat ik u voldoende geïnformeerd heb, en zie uw reactie graag tegemoet.

Met vriendelijke groet,

10.2.e



Advies aan CCD

B

Datum 22 februari 2018
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20171326

Instelling: Biomedical Primate Research Centre
Onderzoeker: 10.2.e
Project: Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines
Aanvraagnummer: AVD20171326
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	De aanvrager is nog de volgende vraag gesteld: - Het is in bijlage 3.4.4.1 onduidelijk hoe vaak een huidbiopt wordt genomen en hoeveel tijd tussen de verschillende biopten zit. Graag dit verhelderen.			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		18	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Niet menselijke primaten
3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		120	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Niet menselijke primaten

Citaat: In order to investigate the presence of residual vaccine virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage due to the vaccine virus, it is necessary to euthanize the animals. This may not be the case in all experiments, If sufficient data are obtained, the animals from subsequent studies need not to be euthanized and can be re-used in other experiments after the vaccine virus has been cleared. The latter decision will be communicated and discussed with the AWB.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques / Rhesusapen (*Macaca mulatta*): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.
- 3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques / Rhesusapen (*Macaca mulatta*): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
Maatschappij	11.1

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Het experiment wordt uitgevoerd met niet-humane primaten, namelijk de resus aap (<i>Macaca mulatta</i>). De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de nauwe overeenkomsten tussen het immuunsysteem van de resusaap en de mens, inclusief de typen afweercellen in de huid. Eerdere experimenten hebben aangetoond dat de sterkte van de door vaccinatie opgewekte immunologische responsen tegen de hier te testen virussen voorspellend zijn voor de beschermende werking van het vaccin in mensen. Het is daarvoor belangrijk dat het immuunsysteem van de diersoort waarin het vaccin getest wordt zo veel mogelijk overeenkomt met dat van de mens.</p> <p>Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt, mits de voorafgaande experimenten niet kunnen interfereren met de huidige proefuitkomsten. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: Citaat: Rechtvaardigt het testen van innovatieve combinatievaccins tegen rabiës plus gele koorts of Japanse encefalitis het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren.</p> <p>De waarden die voor de samenleving in het geding zijn zijn gelegen in het ontwikkelen van nieuwe goedkopere en makkelijker te distribueren combinatievaccins tegen hondsdolheid plus gele koorts of hondsdolheid plus Japans encefalitis. Naar verwachting leidt dit tot vermindering van het aantal ziektegevallen en doden als gevolg van infectie met bovenstaande virussen. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor de kwaliteit van leven</p>
-------------------	--

van de mensen. Gezien de ernst van de ziektes en het aantal aangedane personen wordt het belang voor de samenleving als groot ingeschat. Het belang wordt verder ondersteund door het feit dat dit onderzoek door de EU wordt gefinancierd.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren

handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Ze kunnen hierdoor mogelijk ziek worden en enige pijn ondervinden door beperkte chirurgische ingrepen, bloedafnames en injecties. De dieren ondervinden hiervan licht tot matig nadeel.

De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de toepasbaarheid van vaccins gebaseerd op het PLLAV platform ter voorkoming van rabïes in combinatie met ofwel gele koorts of Japans encefalitis. Ook kunnen de resultaten leiden tot een beter begrip omtrent extrapoleerbaarheid naar de mens. Daarmee is dit onderzoek innovatief, informatief en het is de uitdrukkelijke bedoeling om dit te publiceren. Gezien de mogelijkheden tot een bredere toepassing van dit vaccin platform wordt het belang als groot ingeschat.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot de ontwikkeling van nieuwe vaccins die gemakkelijk gebruikt kunnen worden voor grootschalige bestrijding van hondsdolheid in mensen (en wellicht ook in honden), gele koorts en Japans encefalitis. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

De DEC concludeert dat de belangen van de samenleving die worden nagestreefd in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de betrokken proefdieren.

Het onderzoek is van groot belang voor miljoenen mensen in verschillende delen van de wereld. Het aantal doden veroorzaakt door infectie met een van de drie virussen waar de vaccins tegen ontwikkeld worden kan met behulp van een vaccinatieprogramma gebaseerd op de nieuwe vaccins aanmerkelijk gereduceerd worden. Bovendien kan het hier te testen vaccin platform in de toekomst mogelijk ook worden toegepast voor bescherming tegen andere pathogenen.

De expertise voor het verrichten van deze experimenten is beschikbaar binnen de instelling en bij de betrokken onderzoekers. De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek naar vaccins tegen verschillende virussen. De vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten is ruimschoots aanwezig. Door de zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens zullen de uitkomsten van dit onderzoek een betrouwbare voorspelling geven voor de werking van het vaccin in mensen. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek en worden sociaal gehuisvest. De 3Vprincipes worden

gehonoreerd door hergebruik van dieren, en training van dieren voor het meewerken aan biotechnische handelingen (training onder beloning). Het ongerief is maximaal matig. Humane eindpunten worden toegepast en zijn zorgvuldig beschreven.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling is het noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid van de kandidaat vaccins te onderzoeken in een diermodel dat grote overeenkomsten vertoont met de mens. De effecten van de kandidaat vaccins kunnen in dit diermodel goed worden onderzocht en ook kunnen eventuele nadelige effecten aan het licht komen.

Gezien de grote voordelen van het beschikbaar komen van een goedkoop, breed toepasbaar en effectief combinatie vaccin platform tegen diverse ziekteverwekkers is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij
- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

De vragen betroffen: Enige tekstuele aanpassingen, nadere toelichting omtrent hoofddoelstelling, de te gebruiken vaccin technologie, fasering van de studies in bijlage 1, nadere onderbouwing van het benodigde aantal dieren. Tevens werd gevraagd om aanvullende informatie over biotechnische handelingen en humane eindpunten. Na aanpassing van de tekst werd bij een tweede bespreking verdere uitleg gevraagd over het aantal benodigde dieren per test groep in bijlage 1 en de go/no go momenten voor studies beschreven in bijlage 1 en 2.

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. Een van de DEC leden was betrokken bij de aanvraag. Deze persoon heeft zich teruggetrokken van de vergadering bij de bespreking van de aanvraag en overigens geen aandeel gehad in de afweging en advisering.
Het DEC advies is volledig, goed navolbaar en goed onderbouwd.	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	Citaat: The objectives of this project are to: 1) develop an immunization protocol for use with PLLAV-based vaccines, and to 2) evaluate the efficacy of novel PLLAV-based vaccines in rhesus macaques.
Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Citaat: This project is part of a larger research project with the ultimate goal to develop PLLAV-YFVax as universal vaccine platform technology for emerging infectious diseases, not limited to only viral infections. In the last two decades, the world experienced several outbreaks of virus infections caused by then unknown or less-known viruses, like Ebola, Zika, SARS, MERS, West Nile, Chikungunya, and avian influenza virus. These so-called 'emerging infectious diseases' or 'EIDs' are likely caused by (combinations of) socio-economic, environmental, and ecological factors, like climate change, international travel, changes in land use or agricultural practices etc. [...]. The abruptness of the outbreaks, that are associated with considerable morbidity and mortality, emphasizes the importance of the development of vaccines and antiviral compounds against EIDs [...]. As a result, there is a great demand for vaccine technologies that allow rapid development of safe and easy-to-produce vaccines against emerging infectious agents. The successful development of PLLAV-YFVax-RABV and PLLAV-IEVax-RABV will be a major step towards the development of PLLAV-YFVax as a universal vaccine platform for EID, but also for other infectious agents.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1 [redacted]
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/onderzoeksgroep en onderzoek	Citaat uit DEC advies: Dit onderzoek zal worden uitgevoerd binnen een internationaal consortium in het kader van een door de EU gehonoreerd project. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven blijkt uit de jarenlange ervaring met het uitvoeren van vaccin onderzoek in makaken en de aandacht voor toepassing van vermindering en verfijning bij de dierproeven. 11.1 [redacted]

3V's

Vervanging

3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus

macaques: Citaat: With today's state of scientific knowledge, vaccines for human use can still only be developed using animal studies. Recent studies in rodent models have demonstrated the potency of the PLAVV-YFVax technology to induce protection against the yellow fever virus infection. However, because the immune system of rodents is evolutionarily distant from that of humans, these findings have only a limited predictive value for the effectiveness of vaccine-induced immune responses in humans [1-4]. Thus, the predictive value of rodents for the efficacy of DNA vaccines for human use is limited.

The main objective of this project is to develop the PLAVV-YFVax technology, and to ready this technology for pre-clinical development. In vitro expression studies, and studies in rodents will play an important role in the early steps of the PLAVV-YFVax development. These studies will be used to assess the potential of novel constructs to produce LAVs, to test their immunogenicity, and to determine the safety in rodent models. But the nonhuman primate animal model, with its immunological and physiological similarities to humans, is most suitable preclinical model for evaluating the effectiveness and safety of this novel vaccine platform. In addition to the abovementioned similarities between NHP and humans, the use of different strategies to immunize animals in the skin requires an animal model with a skin architecture much like that of humans. NHP also fulfill this requirement [5,6],

3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques:

Citaat: With today's state of scientific knowledge, vaccines intended for use in humans can still only be developed using animal studies. Recent studies in rodent models have demonstrated the potency of the PLLAV-YFVax -technology to induce protection against the yellow fever virus infection, However, because the immune system of rodents is evolutionarily distant from that of humans, these findings have only a limited predictive value for the effectiveness of vaccine-induced immune responses in humans [1-4].

The main objective of this project is to develop the PLLAV-YFVax technology for the production of vaccines, and to ready this technology for pre-clinical development. Rodent models will play an important role in the early steps of the PLLAV-YFVax development, but the nonhuman primate animal model, with its immunological and physiological similarities to humans, is the most suitable preclinical model for evaluating the effectiveness and safety of this novel vaccine platform

Verminderen

	<p>3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques: Citaat: This animal procedure involves the development of a protocol for intradermal injection of PLAVV in the skin of macaques. A small-scale study in macaques already provided proof-of-concept for the PLLAV technology in macaques. Because of the explorative nature of the study no statistical support for the number of animals can be provided. Everything will be done to keep the number of animals that will be used in this phase of the project as low as possible. Each study will be performed in a step-wise design, starting with two animals per parameter. Only when no sufficient results are obtained, extra animals will be used in a second study after approval of the institutional Animal Welfare Body.</p>
	<p>3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques: Citaat: Statistical calculations for the number of animals per vaccine group will be based on the results of published studies in macaques using commercial vaccines for YFV, JEV, and RABV. This power analysis will give the minimum number of animals required for a statistically valid experimental design. Furthermore, we aim to evaluate different vaccine candidates in a single experiment, so that a single control group can be used and the number of animals needed can be reduced significantly.</p>

Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques: Citaat: Immunization will be performed without a needle using needle-free injection methods. Needle-free injection methods are virtually painless and will reduce the risk of trauma because the immunization causes less damage to the tissue. Biopsies will be taken under anesthesia. After skin biopsies are taken, the wounds will be stitched, and analgesia will be administered. The animals are trained to work voluntarily as possible to invasive biotechnical actions such as giving of an anesthetic, or immunization. All observations will be documented and registered in a digital database at the institute. For the experiments, the standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of vaccine-related side-effects.</p>
	<p>3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques: Citaat: In case of YFV, JEV, and RABV vaccines, the immune correlates of protection in macaques are known. This makes an experimental infection with these viruses after immunization superfluous, and thus, viral challenge is not a part of the studies. This significantly reduces the discomfort caused to the animals by the experimental procedures. Immunization will preferentially be performed without a needle using needle-free methods. These methods are virtually painless and may reduce trauma because the immunization causes less damage to the tissue. The immunizations and blood collections will be performed under sedation, and at the same time body temperature and body weight will be measured, The animals are trained to comply voluntarily as much as possible with invasive biotechnical procedures such as giving of an anesthetic or immunization. During the study, the animals will be monitored daily by experienced animal caretakers, and at each sedation time-point the animals will be examined. Changes in behavior, appetite, appearance etc. will be documented. These, including changes in blood parameters, will be used to prepare a clinical score list for use in future PLLAV-related studies. If an animal shows behavioral changes, weight loss, or illness it will be decided in consultation with the veterinarian whether treatment is needed. In case of severe illness, an animal it will be taken directly off the protocol and will be euthanized to prevent further distress.</p>
	<p>3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques: 11.1</p>
	<p>3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques:</p>
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.

3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques: Citaat: The animals that will be used in the experiments may have been used in previous, unrelated studies. Animals that have been used previously in other flavivirus studies are not suitable for re-use because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. Given the long life expectancy of this species, the animals may be re-used within the legal framework as described in art. 1e of the Law on Animal Experimentation (Wet op de Dierproeven).

De dieren hebben in eerdere studies geen ernstig ongerief ervaren.

3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques: Citaat: The animals that will be used in the experiments may have been used in previous, unrelated studies. Animals that have been used previously in other flavivirus or rabies virus studies are not suitable for re-use because of the strong immunological cross-reactivity between the different viruses. Given the long life expectancy of this species, the animals may be re-used within the legal framework as described in art. 1e of the Law on Animal Experimentation (Wet op de Dierproeven).

De dieren hebben in eerdere onderzoeken geen ernstig ongerief ondervonden.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques	HEP: <1%	Citaat: During the study, the animals are monitored twice daily for changes in general behaviour. When sedated, the animals are examined for local adverse effects. If an animal is seriously ill, the veterinarian will be informed. If the animals cannot be treated, this will be seen as a humane endpoint and the animal will be euthanized.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: Matig	
3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques	HEP: <1%	Citaat: Because serious side effects due to YFV, IEV or RABV live-attenuated vaccines have not been described in macaques, it is not possible to provide clear criteria to define a humane endpoint. However, through intensive monitoring of the animals after immunization deviations in behaviour, appetite, etc. will be noticed quickly. In addition, the animals are weighed at each blood sampling. A large weight loss of >20% relative to the weight at the start of the study can be considered a humane endpoint. If changes in behavior are noticed, or a large weight loss is monitored, the veterinarian will be consulted. The veterinarian will decide if the animal has reached a humane endpoint and needs to be euthanized,
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

In het project zullen NHP worden ingezet. De noodzaak hiervoor is 5.2 lid1

Beoordeling achteraf is nodig vanwege gebruik van niet-humane primaten.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

Het Secretariaat adviseert **5.2 lid1**

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

8 Concept beschikking voor akkoord CCD



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Biomedical Primate Research Centre
10.2.e
Postbus 3306
2288 GJ RIJSWIJK
10.2.g

**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
AVD5020020171326
Bijlagen
1

Datum 22 februari 2018
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e,

Op 6 november 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines" met aanvraagnummer AVD5020020171326. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 22 februari 2018 tot en met 31 december 2022.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie (DEC) 10.2.g gevoegd. Dit advies is ontvangen op 6 november 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:
22 februari 2018
Aanvraagnummer:
AVD5020020171326

Nadere vragen aanvrager

Op 29 januari 2018 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op een verheldering van het maximaal aantal huidbiopten dat per dier genomen zal worden. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d van de wet. Beoordeling achteraf is nodig vanwege gebruik van niet-humane primaten. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

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).

Datum:


22 februari 2018

Aanvraagnummer:

AVD5020020171326

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2.g



ir. J.F.M. Daemen
Wvd. 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: Biomedical Primate Research Centre
Adres: Postbus 3306
Postcode en plaats: 2288 GJ RIJSWIJK
Deelnemersnummer: 50200

deze projectvergunning voor het tijdvak 22 februari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Evaluation of a novel vaccine production technology for the development of nextgeneration rabies-flavivirus combination vaccines" met aanvraagnummer AVD5020020171326, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Section Head Molecular Virology.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 6 november 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 6 november 2017;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques, zoals ontvangen op 6 november 2017;
 - 3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques, zoals ontvangen op 6 november 2017;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 6 november 2017;
 - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 6 november 2017
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 januari 2018.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Development of PLLAV delivery protocol in rhesus macaques			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	18	Matig
3.4.4.2 Evaluation of PLLAVs in rhesus macaques			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	120	Licht

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken

Aanvraagnummer:

AVD5020020171326

of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD5020020171326

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

Aanvraagnummer:

AVD5020020171326

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.

Levensloofdossier

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloofdossier bijgehouden worden.

Niet-menselijke primaten

De Minister heeft een ontheffing verleend volgens artikel 10e lid 7, die het gebruik van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige

Aanvraagnummer:
AVD5020020171326

mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.