

	Inventaris Wob-verzoek W21-04									
			wordt verstrek			weigeringsg ronden				
nr.	documenten NTS20172884	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.2, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraagformulier				x		x		x	
2	Projectvoorstel				x				x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x						
4	Bijlage dierproeven 1 oud				x				x	
5	Bijlage dierproeven 2				x				x	
6	Bijlage dierproeven 3 oud				x				x	
7	DEC-advies				x		x		x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x			
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x			
10	Reactie aanvulling aanvraag				x		x			
11	Niet-technische samenvatting nieuw	x								
12	Bijlage dierproeven 1 nieuw				x				x	
13	Bijlage dierproeven 3 nieuw				x				x	
14	Advies CCD				x		x			
15	Beschikking en vergunning				x		x			



11 SEP. 2017

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 border="1"> <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 colspan="2">10.2.e</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td colspan="2">41146967</td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Lange Kleiweg</td> <td>161</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2">3306</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>2288 GJ</td> <td>Rijswijk</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">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 border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>10.2.e</td> <td>X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2">10.2.e</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2">10.2.e en 10.2.g</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	10.2.e		Afdeling			Telefoonnummer	10.2.e en 10.2.g		E-mailadres											
(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	X Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	10.2.e																									
Afdeling																										
Telefoonnummer	10.2.e en 10.2.g																									
E-mailadres																										
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>10.2.e</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2">10.2.g</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2">10.2.e en 10.2.g</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	10.2.g		Afdeling			Telefoonnummer	10.2.e en 10.2.g		E-mailadres											
(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	10.2.g																									
Afdeling																										
Telefoonnummer	10.2.e en 10.2.g																									
E-mailadres																										
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>10.2.e</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2">10.2.g</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2">10.2.e en 10.2.g</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	10.2.g		Afdeling			Telefoonnummer	10.2.e en 10.2.g		E-mailadres											
(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	10.2.g																									
Afdeling																										
Telefoonnummer	10.2.e en 10.2.g																									
E-mailadres																										

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 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 - 12 - 2017
- Einddatum 31 - 11 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling van antivirale middelen tegen dengue virusinfecties
- 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

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

Functie 10.2.g

Plaats Rijswijk

Datum 07 - 09 - 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': 50200
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment: Biomedical Primate Research Centre
- 1.3 Provide the title of the project: Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection

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.

Dengue virus (DENV) is a mosquito-borne flavivirus with four different antigenically distinct serotypes (DENV-1 to -4). Infection with one of the serotypes can cause dengue fever, which is a severe, flu-like illness primarily affecting infants, young children and adults. Infection with a particular serotype confers life-long immunity against that specific type, but increases the risk of a more severe infection after a new infection with another serotype. In a small proportion of disease cases, such a secondary infection develops into the life-threatening dengue hemorrhagic fever (DHF), resulting in bleeding, low levels of blood platelets and blood plasma leakage, or into dengue shock syndrome (DSS), where dangerously low blood pressure occurs (19,20,21).

The incidence of dengue has grown dramatically around the world in recent decades. Over 2.5 billion people – over 40% of the world's population – are now at risk from dengue. The WHO currently estimates there may be 390 million infections per year, of which 100 million are clinically manifest infections (22). In several Asian countries, DHF has become an important cause of disease and death, mainly in children (18).

Dengue fever is primarily found in tropical and sub-tropical regions around the world. In recent years, transmission of DENV has increased predominantly in urban and semi-urban areas, and has become a major international public health concern. Before 1970, only nine countries had experienced severe dengue epidemics, but the disease is now endemic in 128 countries in Africa, the Americas, the Eastern Mediterranean, South-east Asia and the Western Pacific (22). Not only is the number of cases increasing, the disease continues to spread to new areas. Travel, international trade and climate change have contributed to the introduction of dengue virus and its mosquito vectors (mainly *Aedes aegypti* and *A. albopictus*) into new areas. The global expansion of dengue virus was preceded by the global spread of its mosquito vectors (mainly *Aedes aegypti* and *A. albopictus*) into new areas. Climate change, associated with rising temperatures and shifts in precipitation, has resulted in an expansion of habitats suitable for *A. aegypti* and *A. albopictus* (3,4,11).

The increasing worldwide presence of mosquito vectors for dengue virus transmission has had a major impact on the epidemiology of dengue virus. In the past 25 years, dengue has shown a marked global emergence and re-emergence, with more frequent and larger epidemics associated with more severe disease (12). Until the 1970s, the distribution of each DENV serotype was limited to specific areas in tropical regions, but since then, fueled by demographic and societal changes, but also international trade and travel, their distribution has expanded, and all four serotypes are now widely co-circulating in tropical and subtropical regions (13).

The threat of dengue fever now exists in Europe and the US. Local transmission has been reported for the first time in France and Croatia in 2010, followed by more cases in more recent years (15). In 2012, an outbreak of dengue on Madeira islands of Portugal resulted in over 2000 cases (1).

Despite the fact that DENV is known for decades, only recently, in 2015, the first dengue vaccine has become available, but antiviral drugs for the treatment or prevention of dengue virus infection are currently not available (9,20). In recent years, chemoprophylaxis, i.e. use of antivirals to prevent infection, is gaining more attention as an alternative to vaccination. Chemoprophylaxis could be beneficial for travelers to dengue endemic regions, as well as for vulnerable populations living in endemic regions (21). The concept behind chemoprophylaxis is that a dengue antiviral would be present in the human body prior to being bitten by a dengue-infected mosquito. By blunting the peak viral load (maximum amount of DENV RNA measured in the blood/tissues during viral replication), dengue-associated morbidity and mortality could potentially be reduced significantly, or even prevented. Next to that, a potent and safe dengue antiviral small molecule may also be used as a therapeutic agent.

Presently, only two animal models are used in dengue virus research. Wild-type, and various immunodeficient mice models are used in DENV research to investigate various aspects of DENV pathogenesis. However, a major drawback of these rodent models is that the virus infection is done via the highly artificial intracranial route, and that resultant virus replication is low (24). In contrast, nonhuman primates are the only natural vertebrate hosts besides humans that are susceptible to infection with the four dengue serotypes (16). Rhesus macaques are the only animal model that mimics dengue virus viremia and anti-dengue immune responses in humans (2,24). For antiviral compound evaluation macaques, in contrast to mice, have the advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans

(5,6,10). As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly.

The latter features, in combination with the susceptibility to DENV infection and the similarity of viremia to the human infection, renders the rhesus macaque an important preclinical animal model, and our animal model of choice, to investigate the safety and efficacy of potential anti-DENV compounds for human use.

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 **ultimate goal** is to develop prophylactic and therapeutic intervention strategies for dengue virus infections in humans

The **specific aim of this research project** is to evaluate safety and efficacy of dengue antiviral compounds in rhesus macaques.

Currently, no specific antiviral compounds are available for the treatment of DENV infections, or to be used as a prophylaxis. This research program contributes to the worldwide efforts to develop novel DENV antiviral compounds. Ultimately, after extensive *in vitro* testing, and *in vivo* evaluation in small animal models, antiviral compound safety and efficacy needs to be demonstrated in a suitable NHP species before they can be evaluated in clinical trials (17). The dengue antiviral compounds that will be tested at our institute in macaques will be in the final stages of their preclinical development, and require this last validation step in order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species, and that they are effective in animal species that have a drug metabolism and physiology closely resembling humans.

Our institute has extensive and long-standing expertise in conducting studies using nonhuman primates. Since 2012, we have been working on mosquito-transmitted virus infections in nonhuman primates, like West Nile virus, Zika virus, and dengue virus, and in 2015 we have performed a pharmacokinetics study using an experimental anti-DENV compound. We have the appropriate facilities and experience to work with these pathogenic viruses at DM-3 and ML-3 biosafety conditions. In addition, we have the appropriate virological and immunological assays for assessment of the efficacy against DENV. Our long-standing experience with flaviviruses, including dengue virus, guarantees that these animal studies will be adequately performed.

3.3 Relevance

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

The incidence of DENV worldwide has increased 30-fold over the last 50 years. It has been estimated by the WHO that 100 million clinically apparent dengue virus infections occur every year, resulting in 500.000 hospitalizations due to severe dengue, and 25.000 deaths. The rapid spread of DENV to new territories, and its potential to induce high morbidity and mortality in humans clearly shows the necessity for the development of vaccines, and to the requirement of antiviral compounds.

Dengue virus vaccine development is hampered by a phenomenon known as 'antibody dependent enhancement' (ADE): infection by one of the four dengue virus serotypes confers lasting protection against homotypic re-infection, but a secondary infection with another serotype is associated with an increased risk of severe dengue disease. ADE is caused by antibodies that bind to the virus, but are incapable of neutralizing the virus. The challenge and difficulty in the development of a dengue vaccine is to avoid ADE elicited by vaccine-induced antibodies. Currently, there is only one dengue virus vaccine available which is directed to all 4 serotypes. For younger children, this vaccine is considered unsafe because of possible vaccine-induced ADE. Therefore, the vaccine is only recommended by the WHO for

use in healthy individuals older than 9 years of age that live in endemic areas with high dengue virus burden (25).

Because of the challenges in the development of a safe and efficacious dengue virus vaccine, antiviral drugs are pivotal in dengue-control strategies. Presently, no prophylactic or therapeutic antivirals against dengue virus are available. Prophylactic drugs, i.e. drugs to prevent infection, are beneficial for travelers to dengue endemic regions, as well as for vulnerable populations living in endemic regions. Therapeutic anti-DENV compounds could be used to prevent, or to dampen, disease symptoms related to dengue hemorrhagic fever or dengue shock syndrome. In addition, prophylactic use of antiviral drugs can potentially prevent further spread of dengue virus, as the use of antiviral drugs may lower the number of viremic humans. This will have a direct impact on the infected human host-to-mosquito transmission cycle, resulting in less new infections.

The WHO has launched a Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2010-2020 (23) in which WHO sets three major objectives:

- reduction of dengue mortality by at least 50% by 2020
- reduction of dengue morbidity by at least 25% by 2020, and
- estimation of the true burden of disease by 2015

The research described in this project fits within this WHO strategy, and the proposal will contribute significantly to the first two objectives set by the WHO.

References to section 3:

1. Alves, M. J., Fernandes, P. L., Amaro, F., Osório, H., Luz, T., Parreira, P., et al. (2013). Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal, October 2012. *Eurosurveillance*, 18(6).
2. Bente, D. A., and Rico-Hesse, R. (2006). Models of dengue virus infection. *Drug Discovery Today Disease Models*, 3(1), 97-103.
3. Brown, J. E., Evans, B. R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., et al. (2013). Human Impacts Have Shaped Historical and Recent Evolution in *Aedes Aegypti*, the Dengue and Yellow Fever Mosquito. *Evolution*, 68(2), 514-525.
4. Carvalho, R. G., Lourenço-de-Oliveira, R., & Braga, I. A. (2014). Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(6), 787-796.
5. Chih-Ming, L., Faggioni, R., and Roskos, L.K. (2015) Pharmacokinetics of human therapeutics characterized in nonhuman primates. In: *The Nonhuman Primate in Nonclinical Drug Development and Safety Assessment*. Academic Press
6. Clemons, D.J., Meador, V., Weinbauer, G.F., and Wakefield, G.A. (2012) Safety and Efficacy Evaluation Using Nonhuman Primates. In: *Nonhuman Primates in Biomedical Research vol.2* Academic Press
7. De Alwis, R., Williams, K. L., Schmid, M. A., Lai, C.-Y., Patel, B., Smith, S. A., et al. (2014). Dengue viruses are enhanced by distinct populations of serotype cross-reactive antibodies in human immune sera. *PLoS Pathogens*, 10(10), e1004386.
8. Fink, J., Gu, F., and Vasudevan, S. G. (2006). Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol*, 16(4), 263-275.
9. Halstead, S. B., and Russell, P. K. (2016). Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. *Vaccine*, 34(14), 1643-1647.
10. Itoh, Y. (2016). Translational research on influenza virus infection using a nonhuman primate model. *Pathology International*, 66, 132-141.
11. Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q. N., Shearer, F. M., Barker, C. M., et al. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*, 4, e08347.

12. Mackenzie, J. S., Gubler, D. J., & Petersen, L. R. (2004). Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature Medicine*, 10(12 Suppl), S98-S109.
13. Messina, J. P., Brady, O. J., Scott, T. W., Zou, C., Pigott, D. M., Duda, K. A., et al. (2014). Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends in Microbiology*, 22(3), 138-146.
14. Rezza, G. (2016). Dengue and other Aedes-borne viruses: a threat to Europe? *Eurosurveillance*, 21(21).
15. Rothman, A. L., and Ennis, F. A. (2016). Dengue vaccine: the need, the challenges, and progress. *Journal of Infectious Diseases*, 214(6), 825-827.
16. Sariol, C. A., and White, L. J. (2014). Utility, limitations, and future of non-human primates for dengue research and vaccine development. *Frontiers in Immunology*, 5, 1-15
17. Scientific Committee on Health and Environmental Risks. (2009). Non-human primates in research and safety testing. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/en/non-human-primates/index.htm
18. Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., and Roberts, C. (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 15(12), 745-759.
19. Wallace, D., Canouet, V., Garbes, P., and Wartel, T. A. (2013). Challenges in the clinical development of a dengue vaccine. *Current Opinion in Virology*.
20. Whitehorn, J., and Farrar, J. (2010). Dengue. *British Medical Bulletin*, 95(1), 161-173.
21. Whitehorn, J., Yacoub, S., Anders, K. L., Macareo, L. R., Cassetti, M. C., Nguyen, V. V. C., et al. (2014). Dengue therapeutics, chemoprophylaxis, and allied tools: state of the art and future directions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8), e3025.
22. World Health Organization. Fact sheet Dengue and severe dengue. July 2016.
23. World Health Organization. (2010) Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2010-2020. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75303/1/9789241504034_eng.pdf?ua=1
24. Zompi, S., and Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 4(12), 62-82.
25. World Health Organization (2016) Dengue vaccine: WHO position paper -July 2016. *Weekly Epidemiological Record*, 91, 349-364.

3.4 Research strategy

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

The evaluation of the efficacy of an antiviral compound to protect against infection (prophylactic use), or to interfere with an ongoing dengue infection (therapeutic use) requires that the virus inoculum stock of each new strain/serotype is tested for its infectivity and the course of viremia in the nonhuman primate species used, prior to efficacy testing (**Appendix 1**). Virus infection is performed by inoculating the animals via various routes; i.e. intradermal, subcutaneous, or intravenous, using different doses, or by infection using dengue virus-infected mosquitoes. Then, the onset of viremia, its duration, and the total virus production in blood are determined.

Determination of the optimal dosage of an antiviral compound requires that this compound is administered to a number of NHP using various routes; i.e. oral, intravenous, and that at various time-points post-administration the level of the active compound is determined in the animals (**Appendix 2**).

The efficacy of a specific antiviral compound is determined using two different study protocols: a **prophylactic efficacy study**, and/or a **therapeutic efficacy study protocol**. In both study protocols a standard viral inoculum (determined in Appendix 1), and an established antiviral compound dose (determined in Appendix 2) will be used. In the prophylactic efficacy study protocol animals will first be given an antiviral compound, followed by experimental infection with the virus. In the therapeutic efficacy study protocol, the animals will first be infected and at a later time-point be given the antiviral compound. In both protocols, the decrease in blood viral load will be measured as an indicator of antiviral activity (**Appendix 3**)

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

1. Dengue virus infection in NHP.

In order to establish the infectivity and to characterize the course of viremia of a dengue virus stock, animals will be infected and monitored for clinical symptoms, body temperature (fever), body weight, and changes in blood parameters. Blood samples will be collected to determine several virological parameters, like start of viremia, peak viremia, and the amount of virus produced. To evaluate a new virus or viral stock, the virus may be inoculated via different routes; i.e. intradermal, subcutaneous, or intravenous.

2. Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in NHP.

For this type of study, animals will be administered with different dosages of an antiviral compound. If necessary, the compound may be given at multiple time-points over a certain time period. At regular time-points after administration, blood samples will be collected for measurement of the concentration of the compound, or active component thereof. In parallel, blood chemistry and hematology will be performed to monitor for adverse effects of the compound. General behaviour, health and body temperature will also be monitored.

3. DENV antiviral efficacy study in NHP.

The efficacy of a specific compound against dengue virus may be determined using two different study protocols: a prophylactic efficacy study, or a therapeutic efficacy study protocol, depending on the research question. In both protocols a standard viral inoculum, and an established antiviral compound dose will be used.

In the prophylactic efficacy study protocol animals will first be given an antiviral compound, followed by experimental infection with the virus. In the therapeutic efficacy study protocol, the animals will first be infected, and at a later time-point be given the antiviral compound. In the protocols, the absence or decrease in blood viral load will be measured as an indicator of antiviral activity. Additionally, during the studies the animals will be monitored for adverse effects of the compound, including monitoring of general behaviour and health. A group of non-treated animals will be included as infection controls.

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.

Antiviral efficacy testing in macaques requires that the viral inoculum used establishes a viral infection with a viral kinetic profile resembling that of human DENV infection. Therefore, the viral inoculum first needs to be tested in an infection study, as described in Appendix 1. Requirements to proceed from the dengue virus infection study to an antiviral compound efficacy study are:

1. All animals have to become infected, and
2. Variation between animals has to be limited. A high standard deviation value in the infection study directly affects the group size in an antiviral efficacy study, in order to obtain statistically significant results.

All antiviral compounds which will be evaluated in this research project meet the following criteria:

- the compound must have been tested in cell cultures for absence of toxicity and *in vitro* efficacy
- the compound must have been evaluated in small animal models for absence of toxicity
- if compounds can be adequately tested for their therapeutic or prophylactic effect in other than in the rhesus macaque model, macaques will not be used.

Anti-dengue virus compounds that fulfil the criteria for evaluation in macaques may be tested in a DENV antiviral compound efficacy study (Appendix 3). Before initiation of such a study, a PK study with the test compound has to be performed in order to determine the dosage needed to obtain sufficiently high levels of the active compound in the blood of a group NHPs (Appendix 2).

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Dengue virus infection in nonhuman primates
2	Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates
3	DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project Ontwikkeling van antivirale middelen tegen dengue virusinfecties
- 1.2 Looptijd van het project 1 december 2017 - 1 december 2022
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) Antivirale middelen, dengue virus, effectiviteit, apen

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Dengue is een door muggen overgedragen infectie die wordt veroorzaakt door het dengue virus. Dengue gaat gepaard met ernstige, griepachtige verschijnselen, en is in een deel van de patiënten levensbedreigend. De Nederlandse term voor dengue, knokkelkoorts, verwijst naar één van de kenmerkende symptomen: hevige gewrichtspijn. Het aantal gevallen van dengue is sterk toegenomen in de laatste decennia. Meer dan 2,5 miljard mensen (meer dan 40% van de wereldbevolking) lopen het risico op dengue. Jaarlijks zijn er 390 miljoen dengue infecties wereldwijd, waarvan circa 100 miljoen infecties resulteren in ziekteverschijnselen. Per jaar resulteert dit in een half miljoen ziekenhuis opnames en 25 duizend sterfgevallen.
- Dengue komt vooral voor in tropische en subtropische gebieden over de hele wereld. In de afgelopen jaren is er een sterke toename van dengue. Vóór 1970 hadden slechts negen landen ernstige dengue-epidemieën meegemaakt. De ziekte wordt nu echter aangetroffen in meer dan 100

landen in Afrika, Amerika, het oostelijke Middellandse Zeegebied, zuidoost Azië, en de westelijke Stille Oceaan, en de dengue blijft zich verspreiden naar nieuwe gebieden, mede door de opwarming van de aarde en de toename in internationale handel en reizen.

Momenteel is slechts één dengue vaccin beschikbaar. Dit vaccin biedt echter geen volledige bescherming tegen alle dengue virusvarianten, geeft slechts bescherming voor een periode van 5-6 jaar, en daarnaast moet het vaccin meerdere malen worden toegediend voor optimale bescherming. Ook is niet geschikt voor gebruik bij kinderen jonger dan 9 jaar.

Antivirale middelen zijn daarom van grote (aanvullende) waarde voor de bestrijding van dengue. Echter, antivirale middelen zijn voor de behandeling van dengue zijn nog niet beschikbaar. Het doel van dit project is om antivirale middelen te ontwikkelen en te testen in makaken, die kunnen worden gebruikt om dengue virusinfecties te voorkomen (profylactisch gebruik), of te genezen (therapeutisch gebruik).

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Het uiteindelijke doel van de experimenten die in het kader van dit project worden uitgevoerd is om antivirale middelen te ontwikkelen tegen het dengue virus. Bij profylactisch gebruik zouden deze middelen bescherming kunnen bieden tegen dengue virusinfecties die worden opgelopen tijdens (kortdurende) bezoeken aan dengue-gebieden, bijv. voor vakantie of werk. Therapeutisch gebruik van deze middelen zal het mogelijk maken om dengue virusinfecties te genezen, of om ernstige ziekteverschijnselen of overlijden te voorkomen.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- Er zullen in een periode van 5 jaar maximaal 316 resusapen (*Macaca mulatta*) nodig zijn.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- De dieren kunnen ongerief ondervinden door de biotechnische handelingen, infectie met het dengue virus en het toedienen van kandidaat antivirale middelen
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?
- De maximale aantasting van het welzijn van de dieren zal matig zijn.
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- Afhankelijk van de soort studie, zullen de dieren deel kunnen blijven uitmaken van de experimentele kolonie op het instituut en worden hergebruikt voor ander onderzoek. Naar verwachting zullen maximaal 298 dieren tijdens de infectie en effectiviteit studies experimenteel worden geïnfecteerd met het dengue virus. Zij zullen dan na afloop worden geëuthanaseerd. Dit is nodig om nader onderzoek te doen naar de mogelijke aanwezigheid van virus in verschillende weefsels en organen nadat het uit het bloed is verdwenen, en voor onderzoek naar mogelijke schade aangericht door de dengue virusinfectie.

4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging**
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom
- De kandidaat-antivirale middelen zijn eerst uitgebreid getest op hun werkzaamheid en mogelijke toxiciteit in celkweken. Daarna zijn muizen gebruikt in verschillende fasen van het onderzoek naar de werkzaamheid en toxiciteit. Uiteindelijk moet de veiligheid en werkzaamheid van antivirale verbindingen worden aangetoond in een diersoort welke de meeste overeenkomsten heeft met de mens voordat ze kunnen worden getest in

proefdierlijke alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

klinische studies. Voor dit preklinisch onderzoek zijn makaken het meest geschikt vanwege de grote gelijkenis van hun immuunsysteem, metabolisme, en fysiologie met dat van de mens, en vanwege het feit dat makaken, in tegenstelling tot muizen, een dengue infectie doormaken die het meest overeenkomt met die in de mens. Dit maakt een optimale vertaling van bevindingen naar de mens mogelijk.

4.2 Vermindering

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Voordat een antiviraal middel in apen wordt getest is het al uitgebreid getest op veiligheid en het vermogen om een bescherming te geven tegen dengue virusinfecties in het laboratorium en in het enige andere proefdiermodel voor dengue, de muis. Hierna worden alleen de meest veelbelovende middelen in apen uitgetest. Dit aantal benodigde dieren zal afhangen van de eigenschappen van het middel en van het te gebruiken testvirus. Het aantal zal per experiment worden bepaald op basis van de op dat moment beschikbare gegevens en literatuur. Waar mogelijk zullen meerdere middelen tegelijk getest worden, waardoor maar één controlegroep nodig is. In de farmacokinetiek studies zullen meerdere doseringen worden getest in hetzelfde dier, waardoor het totale aantal dieren in deze studies zo beperkt mogelijk zal zijn. In de effectiviteitsstudies wordt gebruik gemaakt van een twee-fase benadering. Na de eerste fase vindt statistische analyse plaats van de tot dan toe bereikte resultaten. Op basis van deze analyse wordt dan besloten om wel of niet door te gaan met fase 2. Hierdoor wordt voorkomen dat onnodig veel dieren worden.

4.3 Verfijning

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

In de laatste fase van de ontwikkeling van de antivirale middelen, voordat deze in de mens zullen worden gebruikt, worden deze getest in makaken. Dit is essentieel, omdat deze dieren wat betreft hun lichaamsbouw, metabolisme van medicijnen en afweersysteem het meest op de mens lijken. Ook is een dengue infectie in makaken vergelijkbaar met de infectie in de mens. Apen zijn naast de mens het enige zoogdiersoort dat een natuurlijke gastheer is voor het denguevirus. Zij kunnen op vergelijkbare wijze worden geïnfecteerd en ook de ontwikkeling van de infectie is in hoge mate vergelijkbaar met die in de mens. In apen is de kans daarom het grootst dat eventuele onverwachte nadelige effecten alsnog opgespoord kunnen worden, en een goede voorspelling gedaan kan worden wat betreft werkzaamheid bij de mens.

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

Dengue infecties in apen vertonen in het algemeen een mild verloop. Alle handelingen worden uitgevoerd onder verdoving. Waar nodig wordt bovendien pijnstilling gegeven. De dieren worden getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan de handelingen. Tijdens de studie worden de dieren dagelijks geobserveerd. Als een dier ziek wordt zal dit direct aan een dierenarts worden gemeld, en wanneer nodig zal een passende behandeling worden gestart. Indien nodig zal, na overleg met de veterinaire, een dier direct uit een studie worden genomen en op een humane wijze worden gedood om verder ongerief te voorkomen.

Voor de farmacokinetiek studies worden gevoelig meetmethoden gebruikt om de aanwezigheid van het geneesmiddel in het bloed aan te tonen. Daarom zijn slechts kleine hoeveelheden bloed nodig in deze studies.

Om de dieren zo veel mogelijk natuurlijk gedrag te laten vertonen is op het onderzoeksinstituut een uitgebreid programma voor diertraining en kooiverrijking opgezet.

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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 | Dengue virus infection of nonhuman primates |

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.

In order to evaluate the efficacy of an antiviral compound, it is necessary to have a well-defined dengue virus infection model. Previously, we have established a model for infection of macaques with a serotype 2 dengue strain. However, for new dengue viruses, dengue serotypes, or virus stocks that have not yet been tested at our institute, it is necessary to thoroughly characterize the viral kinetic profile in macaques before they can be applied in dengue antiviral compound efficacy evaluation studies. The main objective is to obtain an infection model with high similarity to human infection that is sufficiently robust to allow adequate evaluation of the effectiveness of antiviral compounds, in terms of reduction or prevention of virus replication.

In general, the study set-up is as follows: a group of animals will be infected and monitored for clinical symptoms, fever, body weight and changes in blood parameters. Blood samples will be collected at regular time points to determine if the animals have become infected and what the amount of virus production is. To evaluate a new virus, or viral inoculum, the virus is inoculated using a standard dose.

The primary outcome parameters for dengue virus infection are:

1. the peak viral load (PVL)
2. time-point of start of viremia, and
3. the number of infected animals per inoculum dose.

Secondary outcome parameters for dengue virus infection that will be evaluated are the:

1. viral RNA load over time,
2. duration of viremia, and
3. total amount of virus produced during viremia (AUC; area under the curve)

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

At the start of the study, the animals will be infected by intravenous, intradermal, or subcutaneous inoculation. Experimental infection using different numbers of dengue virus-infected mosquitoes may also be explored as the natural way of human dengue infection. At the same time, blood is collected for a zero-value determination. 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. Typically, after infection of the animals, blood will be collected daily for a period of maximally 14 days to monitor the progress of the viral infection and to control for changes in clinical chemistry and hematology parameters. This intensive sampling is necessary because in this period significant and rapid changes in the amount of virus in the blood may occur. During this period of daily sampling the animals will be given tube feeding because the daily anesthesia has a negative influence on the appetite of the animals. In this way, the wellbeing of the animals is affected as little as possible. After this period, the frequency of blood collection will be brought down to maximally once every two days. After the animals have become virus-negative in the PCR for the first time, they may be followed for 2-3 weeks to confirm absence of the virus and to monitor for potential re-activations of virus replication. Thus, the length of an infection study will be maximally 5 weeks. At the end of the study, the animals will be humanely euthanized and necropsy will be performed for the collection of tissue samples for histopathological and virological tests. The latter will be done to investigate tissue and organ distribution of the virus, and to identify potential viral reservoirs. Viral reservoirs may contribute to virus re-activation, and are therefore of particular interest as targets for antiviral compounds. The details of each study, regarding the route of infection, dose used, etc., will be submitted for approval 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.

Presently, no or limited data are available regarding infection of rhesus macaques with low inoculum doses, as well as on the variation in viremia in macaques caused by different DENV serotypes in macaques. Therefore, no statistical calculations can be made regarding the number of animals needed in the infection studies. The group size is based on experience in flavivirus infection models, including DENV. We expect that with this number of animals, an adequate assessment can be made regarding the reproducibility of infection (all animals need to show virus replication), and on the variation in viremia, as measured in plasma. On the basis of the data from the experimental infections, a power calculation can be made about the number of animals needed in an antiviral compound evaluation study.

B. The animals

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

The experiments will be performed in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) $n = 90$. All rhesus macaques are purpose bred at our institute, or incidentally they will be obtained from a certified supplier in compliance with EU legislation. Both mature male and female animals can be used.

Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are highly susceptible to DENV infection and best mimic dengue virus infection and pathogenesis in humans (1-11). Additionally, their body weight allows the collection of relatively large blood volumes. This is crucial for experimental infection studies as the monitoring of viremia necessitates daily sampling for an extended period. For these reasons, rhesus macaques are the species of choice for the infection studies described here.

For each virus, or virus stock, we will test different inoculum doses in order to identify the inoculum that results in an optimal infection rate, a high peak viremia, in combination with an onset of viremia similar to that in humans, i.e. 3-7 days. A group size of six animals per inoculum is chosen because this will provide us with a reasonable estimate of the variability in infection rate and viremia for the different inocula. From the infection studies using different doses, an inoculum dose will be selected for use in antiviral efficacy studies.

The selection of the inoculum dose depends on the combination of the three primary outcome parameters: the PVL, onset of viremia, and number of infected animals. A thorough characterization of the inoculum is key to the antiviral compound efficacy studies, as a 1 log drop of the PVL under treatment versus vehicle is considered a biological relevant effect in the efficacy studies, and the

standard deviation (SD) value obtained in viral titration study directly influences the number of animal needed in the experimental groups (See Appendix 3, section 2A).

Therefore, a second, independent, infection study is planned, using the selected inoculum dose, to in-depth characterize the inter-animal variability of the selected inoculum in a larger animal sample size. In a period of 5 years we expect to test a maximum of three viral stock preparations. For each, we anticipate to test maximally 4 doses per viral stock, using 6 animals per group. In total, maximally 3 viral stocks x 4 doses x 6 animals = 72 animals will be used for the infection studies. For further analysis of the inter-animal variability using the selected inoculum dose we calculate maximally 6 animals per inoculum. Thus, an additional maximal number of 18 animals (3 viral stocks x 1 selected dose x 6 animals) are planned for these studies.

References

1. Angsubhakorn, S., Moe, J. B., Marchette, N. J., Latendresse, J. R., Palumbo, N. E., Yoksan, S., & Bhamarapravati, N. (1987). Neurovirulence detection of dengue virus using rhesus and cynomolgus monkeys. *Journal of Virological Methods*, 18(1), 13-24.
2. Bente, D. A., & Rico-Hesse, R. (2006). Models of dengue virus infection. *Drug Discovery Today Disease Models*, 3(1), 97-103.
3. Clark, K., Onlamoon, N., Hsiao, H.-M., Perng, G., & Villinger, F. (2013). Can non-human primates serve as models for investigating dengue disease pathogenesis? *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-17.
4. Freire, M. S., Marchevsky, R. S., Almeida, L. F. C., Yamamura, A. M. Y., Caride, E. C., Brindeiro, P. A., et al. (2007). Wild dengue virus types 1, 2 and 3 viremia in rhesus monkeys. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(2), 203-208.
5. Guy, B., Barban, V., Mantel, N., Aguirre, M., Gulia, S., Pontvianne, J., et al. (2009). Evaluation of interferences between dengue vaccine serotypes in a monkey model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(2), 302-311.
6. Halstead, S. B. (1979). In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *The Journal of Infectious Diseases*, 140(4), 527-533.
7. Halstead, S. B., & Shotwell, H. (1973). Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. II. Clinical laboratory responses to heterologous infection. *Journal of Infectious Diseases* 123(1), 15-22.
8. Marchette, N. J., Halstead, S. B., & Falkler, W. A. (1973). Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. III. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *Journal of Infectious Diseases*, 128(1), 23-30.
9. Onlamoon, N., Noisakran, S., Hsiao, H. M., Duncan, A., Villinger, F., Ansari, A. A., & Perng, G. C. (2010). Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood*, 115(9), 1823-1834.
10. Putnak, R., Fuller, J., VanderZanden, L., Innis, B. L., & Vaughn, D. W. (2003). Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(4), 469-476.
11. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 4(12), 62-82.

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.

Animals that will be used in these experiments, might have been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous flavivirus studies or that have pre-existing antibodies against flaviviruses are not suitable because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the 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

Several animal species, primarily rodents and nonhuman primates have been used to study dengue virus infection. Of these different species, NHPs have the advantage that they physiologically and immunologically most closely resemble humans. This has important implications, both for antiviral compound evaluation as well as for the interaction of the host with dengue virus, since these are affected both by the physiology and by the reaction of the innate and adaptive immune system. The proper evaluation of the antiviral compounds requires adequate infection models in NHP, which is the purpose of the studies proposed here.

Reduction

This animal procedure involves the development of a dengue infection model in rhesus macaques for use in antiviral compound efficacy testing. Because of the expected variability in viral replication kinetics between different viral strains or stocks, no statistical support for the number of animals can be provided at this point. Based on the extensive experience with other viral infection models within the institute where this research will be performed, plus the limited experience with dengue infection in NHP and based on available literature, we expect that six animals per group will be sufficient in the first experiment. On the basis of the outcome of the first study the number of animals needed in follow up experiments can be calculated and less animals may be needed. Only the minimum number of animals needed will be used.

Refinement

Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Infection and bleeding take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or virus infection. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.

All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the 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 dengue-related disease like (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma).

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute. During the studies animals will be observed daily by qualified animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool, they will be documented, and a veterinarian will be informed. Then, if necessary, measures will then be taken. All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relieve the pain, if necessary. During the first 2 weeks of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.

The studies will be performed according the Dutch laws, and will cause no 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?

X 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?

X 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.

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

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

X Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

In case of symptoms caused by dengue virus infection, this can result in pain. For this purpose, oral or parenteral analgesia will be administered after consultation with the veterinarian.

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 virus infection
2. Stress because of recovery from sedation
3. Reduced food intake due to repeated sedations

Explain why these effects may emerge.

1. Intradermal infection can cause mild irritation
2. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling and virus infection. Nausea and disorientation can sometimes be observed during recovery from the sedation.
3. Animals will be sedated daily during the first phase of the infection. This will have influence of the

appetite

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

1. If irritation occurs, this will be mild. It will therefore not be necessary to take additional measures.
2. Recovery of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
3. Animals will receive tube feeding via gavage. This is applied during sedation.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

In humans, approximately 10% of the dengue infections is clinically relevant. Clinical symptoms are very diverse and so far, there is no biomarker to predict the course of disease in advance. Several dengue infection studies have been described in macaques, and few clinical symptoms related to DENV infection have been described. Behavioural changes and some clinical signs have been recorded (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma), but none of these signs has been linked to serious DENV disease in macaques. The general condition of the animals will be monitored and registered in a dengue-customized clinical scoring list. If any of these symptoms is found, animal caretakers will directly contact the investigator and veterinarian. Together with all available information (haematology, clinical chemistry, general behaviour, additional clinical scoring and virological status) the veterinarian will judge the overall condition of the animal and will suggest the required follow up.

In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, the animal will be humanely euthanized at an earliest time point.

Indicate the likely incidence.

It is not expected that any of the animals will meet the criteria for euthanasia, so the percentage is zero

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 is estimated as moderate. This is mainly caused by the daily sedations after dengue virus infection.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

In order to investigate the presence of residual virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage caused by DENV, it is necessary to euthanize the animals

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 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 | Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates |
- 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.

In order to evaluate the efficacy of an antiviral compound in the rhesus macaque model for dengue virus infection at our institute, the pharmacokinetics of the compound are tested using different dosages in order to determine the effective compound concentration in plasma after administration (the 'bioavailability'). If the results of such a PK study are positive, then, studies are planned to test the efficacy of the compound in rhesus macaques, for use as a prophylactic, as well as a therapeutic drug.

In general, the study set-up is as follows: a group of animals will be administered the compound in different doses. Typically, one group of animals will be intravenously given the compound. This group will act as control group, and will provide baseline data of the main PK parameter, like clearance of compound from the body, volume of distribution, and half-life of the compound. The experimental groups will be administered the compound orally and in different dosages. After administration, the animals will be bled at regular time points in order to determine the concentration of the compound in the blood. Comparison of the PK parameter values in the blood after iv administration and those found after oral administration will provide insight in the bioavailability of the compound.

The **primary outcome parameters** for the PK are:

1. the maximum concentration of the active compound in plasma, and
2. the total amount of the active compound in plasma in time

Secondary outcome parameters:

1. time to reach the maximum concentration in plasma,
2. time to last time point that compound is detectable in plasma,
3. half-life of compound

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

A typical PK study consists of groups of animals that are given the antiviral compound at different dosages and/or different routes of administration. One group will receive the compound by intravenous bolus in order to derive the main PK parameters (clearance, volume of distribution, half-life). The other groups will be given the compound orally. The used dosages will be calculated on basis of PK studies in other animal models. Typically, blood samples will be collected at regular time points until 24 h post-administration, and will then be performed daily until the end of the study (maximally 7 days post-administration).

The PK study may be designed as a study in which the animals are first given a low dose of compound. Then, after a wash-out period during which the compound is cleared from the body, the animals can be orally administered a second, higher oral dose of the compound, and blood will be collected at regular time points. Plasma from blood samples will then be analyzed for PK parameters.

As a follow-up to the single-dose PK study, animals may also receive antiviral compounds by repeated administration to determine if this prolonged bioavailability leads to either unwanted accumulation of the substance in the blood, or to an equally unwanted decrease because repeated-dosing influences the body metabolism. A prolonged bioavailability is essential when anti-DENV compounds are used as a prophylaxis, i.e. they should protect against DENV infection by mosquitos for a certain period. Essentially, blood sampling will be similar to a single-dose study, with multiple samplings the first day after administration, followed by daily blood collection until the next drug administration.

The details of each study, regarding the number of animals, the route of administration, dose used, and the time points of blood sampling, will be submitted for approval 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.

A group size of 3 animals is the standard group size for PK studies. From previous PK studies in macaques, it was concluded that experimental groups of three animals are sufficient to obtain a pharmacokinetic profile in blood of the compounds. This group size is sufficiently large to allow insight in the variance between the individual animals and allows us to identify possible outliers.

Block randomization will be used for the group composition. The animals will be randomly allocated to treatment groups according to a randomized block design based on the sex and weight of the animals.

B. The animals

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

The experiments will be performed in 18 rhesus macaques (*Macaca mulatta*). All rhesus macaques are purpose bred at our institute, or incidentally they will be obtained from a certified supplier. Both mature male and female animals can be used.

Rhesus macaques are the species of choice for the PK studies described here. In contrast to other animal species that are used in dengue virus research, i.e. rodents, macaques have the advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans (1-3). As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly. This renders the macaque an important preclinical animal model to investigate the pharmacokinetics of potential anti-DENV compounds for human use.

Rhesus macaques are also the NHP species of choice for the dengue virus infection studies (Appendix 1). As the results of the experimental dengue virus infection of rhesus macaques, and those obtained from the PK studies, will be combined and applied in the antiviral efficacy studies (Appendix 3), it is essential that the pharmacokinetics of the anti-DENV compounds are evaluated in the same species.

In a period of 5 years we expect to test a maximum of three antiviral compounds. On basis of *in vitro* studies, and studies done in rodent models, a dosage range will be set that will then be evaluated in

macaques. For each compound, we plan to evaluate maximally five dosages in a single-dose PK study. The exact number of dosages that will be tested per compound will be decided per study, as this depends on the outcomes from *in vitro* studies and studies in rodents, as well as on experience from studies with related compounds.

In each PK study, 2 groups of 3 animals will receive 3 different dosages of the drug, as described in section A. The exact design of the study, including the number of dosages, will be submitted for approval to the AWB.

For the single-dose PK studies we plan to test maximally 3 compounds. Per compound we will test 6 different dosages (5 dosages+ 1 standard control dose given *i.v.*) in 2 groups of 3 animals = 6 animals per compound. For 3 compounds we will need 18 animals.

For each compound, a repeated-dose administration study is planned with groups of 3 animals. These animals will be selected from the group of animals used in the single-dose PK study.

Thus, over a 5-year period, maximally 18 animals will be needed for the PK studies.

References

1. Itoh, Y. (2016). Translational research on influenza virus infection using a nonhuman primate model. *Pathology International*, 66, 132-141.
2. Clemons, D.J., Meador, V., Weinbauer, G.F., and Wakefield, G.A. (2012) Safety and Efficacy Evaluation Using Nonhuman Primates. In: Nonhuman Primates in Biomedical Research vol.2 Academic Press
3. Chih-Ming, L., Faggoni, R., and Roskos, L.K. (2015) Pharmacokinetics of human therapeutics characterized in nonhuman primates. In: The Nonhuman Primate in Nonclinical Drug Development and Safety Assessment. Academic Press

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.

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the 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.

All compounds have been tested extensively for efficacy and toxicity in *in vitro* assays. Also, *in vivo* toxicity studies have been performed in rodents. Only when no side effects or signs of toxicity are found in the rodent model, the compounds will be evaluated in nonhuman primates.

In this animal procedure, the pharmacokinetic profile of anti-dengue compounds is determined in rhesus macaques, before their use in antiviral compound efficacy testing in the same animal species. A group size of 3 animals is the standard group size for PK studies. From previous PK studies, it was concluded that experimental groups of three animals are sufficient to obtain a pharmacokinetic profile of the compounds in blood of macaques. This group size allows us insight in the variance between the

individual animals, and at the same time allows us to identify possible outliers. Only the minimum number of animals needed, will be used.

Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling or compound administration. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Compound administration and blood sampling take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or compound administration. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.

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

For the PK studies using anti-dengue virus compounds, no safety and/or environmental risks can be envisioned. All compounds have been extensively tested *in vitro* and *in vivo in rodents* for their potential to inhibit dengue virus, but also for presence/absence of toxicity, before their evaluation in nonhuman primates.

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute. During the study animals will be observed daily by qualified animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool then a veterinarian will be informed and measures will be discussed with the investigator and implemented. All handlings will be performed under sedation. On every time point when a handling is performed the animal will be weighed and closely examined. During the period that an animal is bled daily, the animal will receive tube feeding. This is necessary, because animals have to fast the night before the sedation and since animals will be sedated daily after infection the food intake during this period would otherwise be very limited.

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.

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

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

X Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

In case an animal suffers pain, oral or parenteral analgesia may be administered after consultation with the veterinarian.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Stress because of recovery from sedation
2. Reduced food intake due to repeated daily sedations for blood collection and compound administration
3. Discomfort due to administration of compound via gavage

Explain why these effects may emerge.

1. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling and compound administration. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
2. Animals will be sedated daily during the PK study for blood collection. Therefore, the animals will have to fast during that period.
3. Insertion of the tube may cause local irritation

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

1. Recovery 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. This is applied during sedation.
3. Insertion of the feeding tube will be done by experience caretakers. In case irritation occurs, this will be mild and no extra measures need to be taken

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.

It is not expected that animals will reach a humane endpoint due to the PK study. However, through intensive monitoring of the animals, deviations in behavior, appetite etc. will be noted quickly. In addition, the animals are weighed at each blood collection. A major weight loss of > 20% relative to the weight at the start of the study is seen as humane endpoint. In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, it will be humanely euthanized.

Indicate the likely incidence.

It is not expected that the animals reach the humane endpoint criteria. Therefore, the percentage is zero.

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 is estimated as moderate. This is mainly caused by the daily sedations after

compound administration

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

X No

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

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 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 |
|---------------|----------------------------------------------------|
| 3 | DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates |
- 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.

In order to evaluate the use of an antiviral compound to prevent dengue virus infection, we will use the following study set-up: a group of animals will be administered the compound. Then, the animals will be experimentally infected with dengue virus (as defined in Appendix 1), and blood samples are collected at regular time points to determine if the animals have been protected against infection, or if the viremia is influenced by the prophylactic administration of the compound. A group of animals will not receive the compound, and will be used as controls.

When a compound is evaluated for its therapeutic potential, i.e. to cure infection, animals will first be infected with dengue virus, and subsequently the compound will be administered. During the study, blood is collected at regular time points and tested for the presence or absence of virus.

The **primary outcome parameter** for antiviral efficacy will be the peak viral load (PVL).

Other, secondary outcome parameters for dengue virus infection that will be evaluated are:

1. the viral RNA load,
2. the duration of viremia,
3. the total amount of virus produced during viremia (AUC; area under the curve)

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

Prophylactic antiviral study:

At the start of the study, the animals will be administered the antiviral compound. The route of administration and the dosage used are based on a PK study with this compound performed in rhesus macaques (Appendix 2). At the same time blood is collected for a zero-value determination. Then, the animals are experimentally infected. The optimal route and inoculum dose are determined in an infection study with this inoculum in rhesus macaques (Appendix 1). At that time point, a group of animals that did not receive the compound will also be infected, and will act as untreated controls in the study. Typically, after infection of the animals, blood will be collected daily for a period of maximally 14 days to monitor the progress of the viral infection and to control for changes in clinical chemistry and hematology parameters. This intensive sampling is necessary because in this period significant and rapid changes in the amount of virus in the blood may occur in untreated animals. During this period of daily sampling the animals will be given liquid foods by means of a probe because the daily anesthesia necessitates fasting of the animals. In this way, the wellbeing of the animals is affected as little as possible. After this period, the frequency of blood collection will be brought down to maximally once every two days. After the untreated control animals have become virus-negative in the PCR for the first time, the groups may be followed for an extra period of 3-4 weeks to confirm absence of the virus and to monitor for sudden re-activations of virus replication in any of the animals. At the end of the study, maximally 6 weeks after the start, the animals will be humanely euthanized and necropsy will be performed for the collection of tissue samples for histopathological and virological tests. 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.

Therapeutic antiviral study:

The set-up of a therapeutic study using the antiviral compound is essentially similar to the prophylactic study. However, in such a study the animals are first infected and then treated with the antiviral compound.

The details of each study, regarding the route of infection, dose used, number of animals used, will be submitted for approval 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 statistical analysis for the NHP efficacy studies will focus on the peak viral load (PVL) value, which is calculated from the dengue virus infection studies (appendix 1). For PVL a 1 log drop (on log₁₀ scale) under treatment versus vehicle is considered a biological relevant effect.

The design, and more specifically the sample size, of the study will aim to have a minimum of 80% power for detecting this relevant biological effect. Next to the size of the biological effect of interest also the variability in the data drives the required sample size. The true underlying standard deviation (SD) value is currently unknown and will be estimated based on the pilot viral titration study.¹

Currently we work under the assumption of two potential scenarios, the first where the SD is 0.5 and the second where the SD is 1. For these two scenarios a formal power calculation² was performed where the necessary sample size as function of variability and biological effect was assessed under the following assumptions:

- 80% power and 5% type I-error
- One sided testing since we are specifically looking for a directional effect
- 2 group comparison: placebo versus one active dose
- 1:1 randomization ratio between vehicle and active treatment group
- Common variability between the two groups
- Two sample T-test type analysis.

The result is a planned total sample size of 20 or 26 animals for respectively an anticipated scenario with SD of 0.5 and with SD of 1. The actual sample size will be revisited once the viral titration study¹ is finalized where we aim to reliably quantify the actual between animal variability of the parameter of interest and if it changes in function of inoculum used.

B. The animals

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

The experiments will be performed in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) n = 208. All rhesus macaques are purpose bred at our institute, or incidentally they will be obtained from a certified supplier. Both mature male and female animals can be used.

Currently, only two animal models are used in dengue virus research. Mouse models are used in DENV research to investigate various aspects of DENV pathogenesis. However, a major drawback of these rodent models is that the dengue virus infection is done via the highly artificial intracranial route, and that resultant virus replication is low. In contrast, nonhuman primates are the only natural vertebrate hosts besides humans that are susceptible to infection with the four dengue serotypes. Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are highly susceptible to DENV infection and best mimic dengue virus infection and pathogenesis in humans (1-11). Additionally, in contrast to other animal species that are used in dengue research, i.e. rodents, macaques have the great advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly (12-14). The latter features, in combination with the susceptibility to DENV infection and the similarity of viremia to the human infection, renders the rhesus macaque an important preclinical animal model, and our animal model of choice, to investigate the efficacy of potential anti-DENV compounds for human use. Furthermore, the body weight of macaques allows the collection of relatively large blood volumes. This is crucial for the antiviral efficacy studies, as the monitoring of viremia necessitates daily sampling for an extended period.

The study design will be a two-stage design where in the first part 10 animals out of N (being either 20 or 26 depending on scenario given in A.) will be randomized to vehicle and highest dose group to be studied in a 1:1 ratio. After completion of this treatment part, an interim analysis will be performed to estimate the drug effect and test for its significance. The second stage will depend on the results of the first with the following potential scenarios:

1. Significant treatment effect detected: the remaining N-10 animals are randomized into the vehicle, highest dose group and minimum two new dose groups to allow estimation of underlying dose response pattern,
2. Estimated treatment effect ≥ 1 log₁₀ drop but not statistically significant: randomize extra X animals into vehicle and highest dose group and randomize the remaining (N-10-X) into minimum two new dose groups to allow estimation of underlying dose response pattern,
3. Estimated treatment effect < 1 log₁₀ drop and not statistically significant: randomize remaining animals into the vehicle and highest dose group to increase precision of estimated treatment effect or, if other study data allow it, randomize the remaining animals into vehicle and a higher dose group than originally planned.

If the power calculation on basis of the results obtained in the first stage of the study indicates that no statistically significant results can be obtained in stage 2 with the addition of extra animals, this is seen as a 'no-go' for the second stage. The study will then be discontinued after the first stage.

Typically, an antiviral efficacy study consists of one control group of animals and one treatment group (max. 2 x 26 = 52 animals). In a period of 5 years we expect to test a maximum of two antiviral compounds, both in a prophylactic and a therapeutic efficacy study.

In total 208 animals are the maximum needed for the efficacy studies over a period of 5 years. (2 compounds x 2 efficacy studies x 52 animals)

References:

1. Angsubhakorn, S., Moe, J. B., Marchette, N. J., Latendresse, J. R., Palumbo, N. E., Yoksan, S., & Bhamarapravati, N. (1987). Neurovirulence detection of dengue virus using rhesus and cynomolgus monkeys. *Journal of Virological Methods*, 18(1), 13-24.
2. Bente, D. A., & Rico-Hesse, R. (2006). Models of dengue virus infection. *Drug Discovery Today Disease Models*, 3(1), 97-103.
3. Clark, K., Onlamoon, N., Hsiao, H.-M., Perng, G., & Villinger, F. (2013). Can non-human primates serve as models for investigating dengue disease pathogenesis? *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-17.
4. Freire, M. S., Marchevsky, R. S., Almeida, L. F. C., Yamamura, A. M. Y., Caride, E. C., Brindeiro, P. A., et al. (2007). Wild dengue virus types 1, 2 and 3 viremia in rhesus monkeys. *Memórias Do Instituto*

- Oswaldo Cruz*, 102(2), 203-208.
5. Guy, B., Barban, V., Mantel, N., Aguirre, M., Gulia, S., Pontvianne, J., et al. (2009). Evaluation of interferences between dengue vaccine serotypes in a monkey model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(2), 302-311.
 6. Halstead, S. B. (1979). In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *The Journal of Infectious Diseases*, 140(4), 527-533.
 7. Halstead, S. B., & Shotwell, H. (1973). Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. II. Clinical laboratory responses to heterologous infection. *Journal of Infectious Diseases* 123(1), 15-22.
 8. Marchette, N. J., Halstead, S. B., & Falkler, W. A. (1973). Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. III. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *Journal of Infectious Diseases*, 128(1), 23-30.
 9. Onlamoon, N., Noisakran, S., Hsiao, H. M., Duncan, A., Villinger, F., Ansari, A. A., & Perng, G. C. (2010). Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood*, 115(9), 1823-1834.
 10. Putnak, R., Fuller, J., VanderZanden, L., Innis, B. L., & Vaughn, D. W. (2003). Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(4), 469-476.
 11. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 4(12), 62-82.
 12. Itoh, Y. (2016). Translational research on influenza virus infection using a nonhuman primate model. *Pathology International*, 66, 132-141.
 13. Clemons, D.J., Meador, V., Weinbauer, G.F., and Wakefield, G.A. (2012) Safety and Efficacy Evaluation Using Nonhuman Primates. In: Nonhuman Primates in Biomedical Research vol.2 Academic Press
 14. Chih-Ming, L., Faggoni, R., and Roskos, L.K. (2015) Pharmacokinetics of human therapeutics characterized in nonhuman primates. In: The Nonhuman Primate in Nonclinical Drug Development and Safety Assessment. Academic Press

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.

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous flavivirus studies or that have pre-existing antibodies against flaviviruses are not suitable because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the 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

Although animal models for dengue infection other than nonhuman primates (NHP) are also in use in research for DENV, NHP are the animal model that best mimic infection and pathogenesis in humans. Equally, in contrast to other animal species that are used in biomedical research, like rodents, macaques have the great advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly. This, in combination with the fact that DENV infection of macaques, mimics infection and pathogenesis in humans, renders the rhesus macaque preclinical animal model of choice to investigate the efficacy of potential anti-DENV compounds for human use.

Reduction

This study involves the efficacy testing of antiviral compounds in the dengue virus infection model in rhesus macaques. Because the variability in dengue viral replication kinetics in the macaques will only become available after the completion of the infection studies, the exact number of animals to be used in the studies cannot be provided at this point. Under A we have described the statistical analyses that will be performed on basis of the infection studies. Only the minimum number of animals needed will be used. If possible, studies will be combined. In such a case, one control group will suffice and the total number of animals will be reduced.

Refinement

Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Infection and bleeding take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or virus infection. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.

All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, a standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of dengue-related disease like (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma).

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute.

All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database thus facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relieve the pain, if necessary.

During the first 2 weeks of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.

Regular analysis of haematological and clinical chemistry parameters is part of the experiment. During these experiments, the virus load in plasma will also be analysed as primary indicator of infection. These data will also be consulted to determine if changes in behaviour, appetite or stool are clinically relevant. If necessary, judged by the veterinarian, measures will then be taken to treat the animal.

The studies will be performed according the Dutch laws, and will cause no 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?

X 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?

X 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.

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

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

X Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

In case of symptoms caused by dengue virus infection, this can result in pain. For this purpose, oral or parenteral analgesia will be administered after consultation with the veterinarian.

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 virus inoculation
2. Stress because of sedation
3. Reduced food intake due to repeated daily sedations

Explain why these effects may emerge.

1. Intradermal inoculation can cause mild irritation
2. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling and virus inoculation. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
3. Animals will be sedated daily during the first phase of the infection. This will have influence of the appetite

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

1. If irritation occurs, this will be mild. It will therefore not be necessary to take additional measures.
2. Recovery of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
3. Animals will receive tube feeding via gavage. This is applied during sedation for blood collection.

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.

In humans, approximately 10% of the dengue infections is clinically relevant. Clinical symptoms are very diverse and so far there is no biomarker to predict the course of disease on forehand. So far, several dengue infection studies have been described in nonhuman primates. So far, few clinical symptoms related to DENV infection in NHP have been described. Behavioural changes and some clinical signs have been recorded (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma), but none of these signs has been linked to serious DENV disease in macaques. The general condition of the animals will be monitored and registered in a dengue-customized clinical scoring list. If any of these symptoms is found animal caretakers will directly contact the investigator and veterinarian. Together with all available information (haematology, clinical chemistry, general behaviour, additional clinical scoring and virological status) the veterinarian will judge the overall condition of the animal and suggest required follow up.

In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, the animals will be humanely euthanized at an earliest time point.

Indicate the likely incidence.

After DENV infection each animal may become seriously ill. Thus, the percentage is 100%

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 is estimated as moderate

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.

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

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: AVD5020020172884
2. Titel van het project: Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection.
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van antivirale middelen tegen dengue virusinfecties
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam 10.2.g
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e
 - e-mailadres contactpersoon: 10.2.g
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 17-08-2017
 - aanvraag compleet: 17-08-2017
 - in vergadering besproken: 24-08-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 28-08-2017 tot 01-09-2017 en van 06-09-2017 tot 07-08-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 01-09-2017, 06-09-2017 en 07-09-2017
 - advies aan CCD: 08-09-2017
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.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn

opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrek(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 28-08-2017 en 06-09-2017
 - Gestelde vraag/vragen: Enige tekstuele aanpassingen, aanvullende achtergrond informatie, verdere onderbouwing van de noodzaak om te testen in niet-humane primaten, nadere onderbouwing van het aantal benodigde dieren, nadere specificering van de primaire uitkomstparameters. Tevens werd gevraagd om aanvullende informatie over biotechnische handelingen, milieueffecten, verfijning en humane eindpunten
 - Datum antwoord: 01-09-2017 en 07-09-2017
 - Verstrek(e) antwoord(en): Het project is aangepast in het format projectvoorstel dierproeven (ziekteverschijnselen en pathogenese dengue infectie, vergelijk met andere diermodellen) en in de bijlages (onderbouwing aantal benodigde dieren, nadere specificering uitkomstparameters, aanvullende informatie biotechnische handelingen, milieueffecten, verfijning en gebruik klinische scoringstabel voor het monitoren van het verloop van de dengue infectie en voor het vaststellen van humane eindpunten).
 - 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 de immunologie, virologie, statistische analyse, 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 ervaring met het beoordelen van onderzoek naar kandidaat geneesmiddelen tegen virale infecties 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. Het voorgestelde onderzoek bestaat uit drie fasen, te weten 1) het opzetten en optimaliseren van het dengue infectie model om bij de evaluatie van kandidaat antivirale middelen vast te kunnen stellen of deze effectief zijn tegen de infectie, 2) PK studies om de juiste dosering van de kandidaat antivirale middelen te bepalen en 3) evalueren of het kandidaat antivirale middel profylactisch en/of therapeutisch effectief is tegen dengue virus infectie. De subdoelen sluiten logisch aan bij het hoofddoel en vormen een samenhangend geheel.
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. Nevendoelstellingen 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 worden nieuwe kandidaat antivirale middelen getest op hun vermogen om dengue infectie te voorkomen (bij profylactische toepassing) of de dengue virus multiplicatie te verminderen (bij profylactische en therapeutische toepassing).

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 het testen van kandidaat antivirale middelen tegen dengue op veiligheid en effectiviteit in niet-humane primaten. Het uiteindelijke doel is het bijdragen aan het beschikbaar komen van effectieve antivirale middelen tegen dengue, die zowel ter bescherming tegen infectie als therapeutisch kunnen worden toegepast. Naar schatting raken jaarlijks 100 miljoen mensen geïnfecteerd met dengue, worden daardoor een half miljoen in het ziekenhuis opgenomen en overlijden 25 duizend mensen. Bovendien verspreidt het virus zich door toegenomen internationaal handels en reisverkeer en klimaatverandering naar nieuwe gebieden, waar in de menselijke populatie nog geen immuniteit tegen het virus is opgebouwd. Momenteel is er één dengue vaccin beschikbaar dat echter niet even effectief is tegen alle serotypen. Er is nog geen antiviraal middel tegen dengue beschikbaar. Met het beschikbaar komen van antivirale middelen kunnen hopelijk de WHO doelstellingen, namelijk vermindering van de dengue mortaliteit met 50% en de morbiditeit met 25% tegen 2020 gehaald worden. Tevens kan bij gebruik als profylaxis dengue infectie voorkomen worden bij bepaalde risicogroepen, zoals reizigers en medisch personeel. Het betreft hier *pre-klinisch* onderzoek. Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
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 een effectief antiviraal middel tegen dengue zijn de te beschermen personen, de proefdieren en het onderzoeksveld.

Voor de te beschermen personen is het beschikbaar komen van een effectief antiviraal middel

tegen dengue van groot belang, aangezien het de multiplicatie van het virus kan onderdrukken en daardoor de ziekteverschijnselen en sterfte kan voorkomen. Ook kunnen door profylactische toepassing bepaalde risicogroepen beschermd worden, zoals reizigers en medisch personeel.

Het belang voor de samenleving is dat voor bepaalde risicogroepen infectie met dengue voorkomen kan worden en dat met dengue geïnfecteerde personen die ziekteverschijnselen vertonen genezen kunnen worden. Dit resulteert in; een sterke verbetering van de gezondheid van grote groepen mensen, en minder sterft en minder verlies in economische productiviteit.

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

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld d.m.v. publicatie(s). Dit onderzoek kan leiden tot meer inzicht in het vermogen van diverse typen antivirale middelen om dengue virus multiplicatie te verminderen.

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. Hoewel de ervaring met het dengue infectie model vrij beperkt is zijn kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven in grote mate aanwezig op het gebied van infectie van non-humane primaten met onder andere door muskieten overdraagbare virussen alsmede de aandacht voor de drie V's op dit gebied. Kennis en kunde worden verder onderbouwd door de wetenschappelijke output en de verworven interne- en externe financiering.
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. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. 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)

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met dengue virus en de grote gelijkenis met de mens wat betreft het verloop van de infectie en de pathogenese. Bovendien vertoont deze diersoort zeer grote fysiologische overeenkomsten met de mens, hetgeen van belang is voor drug metabolisme, farmacokinetiek en mogelijke interacties met de organen/weefsels. De kandidaat antivirale middelen zijn tevoren gekarakteriseerd qua werkzaamheid en toxiciteit in *in vitro* en *in vivo* (veelal knaagdieren) modellen. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling van kandidaat antivirale middelen is het echter noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid te onderzoeken in een diermodel waarin de aard en verloop van de ziekte grote overeenkomsten vertonen met de mens. De eventuele nadelige effecten (bijvoorbeeld als gevolg van de interactie met het infectieus agens en de organen/weefsels) van de kandidaat antivirale middelen kunnen in dit diermodel worden bepaald.

Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. 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 voldoet 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 correct als matig ingeschat op basis van ervaring met PK en dengue infectie studies in niet-humane primaten en wordt veroorzaakt door de experimentele technieken, de toediening van antivirale middelen en de eventuele klinische symptomen ten gevolge van de infectie. In combinatie zijn de gevolgen van deze handelingen terecht als matig ongerief ingeschat. Door implementatie van humane eindpunten op basis van klinische symptomen wordt ernstig ongerief vermeden. De dieren 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 die voor PK studie worden gebruikt wordt aangetast door de toediening van kandidaat antivirale middelen en frequente bloedafnames. Deze aantasting van de integriteit is van voorbijgaande aard. Bij de overige experimenten wordt de integriteit van de dieren aangetast door dengue virus infectie, de frequente bloedafnames en in een deel van de dieren door toediening van kandidaat antivirale middelen. De dieren worden aan het eind van de studie, of eerder bij het bereiken van een humaan eindpunt, gedood. Het doden van de dieren aan het eind van de effectiviteits studie is nodig om vast te kunnen stellen of nog virus aanwezig is in de weefsels en organen en om eventuele schade aan de weefsels ten gevolge van de infectie te kunnen bepalen.
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. Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven (gebaseerd op algemene en specifieke criteria) en is 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. Nieuwe antivirale middelen worden vaak eerst *in vitro* getest. Echter vaak is dan niet duidelijk of de medicijnen hun specifieke doel binnen het organisme zullen bereiken. Daarom is gebruik van proefdieren noodzakelijk. Verschillende diersoorten worden gebruikt voor onderzoek naar de effectiviteit van antivirale middelen tegen dengue. Echter door fysiologische en anatomische overeenkomsten, en de effecten daarvan op drug metabolisme, farmacokinetiek en interactie met de organen/weefsels, zijn niet-humane primaten het best voorspellend voor effectiviteit bij de mens. In de experimenten in niet-humane primaten kunnen inzichten in effectiviteit en mogelijke bijwerkingen naar voren komen die bij onderzoek met andere diersoorten gemist zouden zijn. Deze stap over te slaan en direct onderzoek met menselijke vrijwilligers te verrichten is in dit stadium van de ontwikkeling van kandidaat antivirale middelen daarom dan ook niet verantwoord.
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. Het aantal dieren dat nodig is voor de studies voor het opzetten van het infectie model (bijlage 1) en voor de PK studies (bijlage 2) is op basis van ervaring uit eerdere studies gekozen en tot een minimum beperkt. Het aantal benodigde dieren voor de *in vivo* evaluatie van de effectiviteit van kandidaat antivirale middelen (bijlage 3) wordt bepaald met behulp van statische powerberekeningen op basis van de gegevens verkregen uit het opzetten van het infectie model. Bij het onderzoeken van meerdere kandidaten geneesmiddelen binnen een proefopzet zal het aantal controlegroepen beperkt worden. Het werkelijk aantal dieren dat gebruikt zal worden in dit project wordt bepaald door het aanbod van kandidaat geneesmiddelen en kan daardoor mogelijk lager uitvallen dan het gevraagde maximum.
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 zo veel mogelijk mee te werken aan bepaalde dier technische handelingen, waardoor ze minder stress ervaren. Sedatie en pijnbestrijding zullen worden toegepast wanneer geïndiceerd. Bij onverwacht grotere welzijnsaantasting dan voorzien zal een humaan eindpunt worden toegepast. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
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, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. Bij PK studies zullen de dieren in leven blijven aan het einde van het experiment. De dieren waarbij inoculatie met dengue heeft plaats gevonden worden gedood aan het einde van het experiment om de pathologie te bepalen en de aanwezigheid van het virus in de weefsels te meten. Daarnaast worden dieren ge-euthanaseerd wanneer humane eindpuntcriteria worden bereikt, dit om verder ongerief te voorkomen (zoals gedefinieerd in de projectaanvraag). 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 nieuwe kandidaat antivirale middelen tegen dengue 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 of andere onderzoeks modellen.
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 voor de samenleving zijn gelegen in het ontwikkelen van antivirale middelen tegen dengue. Naar schatting raken jaarlijks 100 miljoen mensen geïnfecteerd met dengue. Bij een half miljoen mensen leidt de ziekte tot ziekenhuis opname en 25 duizend mensen overlijden ten gevolge van de ziekte. Er is één dengue vaccin beschikbaar dat echter niet even effectief is tegen alle serotypen. Er zijn nog geen antivirale middelen beschikbaar. Met een effectief antiviraal middel kan ziekte en sterfte en in bepaalde doelgroepen infectie voorkomen worden. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn van de samenleving (minder doden, minder zieken).

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 in lichte mate ziek worden en enige pijn ondervinden door bloedafnames, injecties en infectie met dengue. De dieren ondervinden hiervan matig ongerief.

De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de werking van potentiële antivirale middelen tegen dengue. Daarmee is dit onderzoek informatief en het is de uitdrukkelijke bedoeling om dit te publiceren.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van antivirale

middelen die ernstige ziekte en sterfte ten gevolge van dengue infectie kunnen voorkomen. 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 mensen, omdat het ontwikkelen van een effectief antiviraal middel tegen dengue met dengue geïnfecteerde mensen kan genezen en mogelijk infectie met dengue kan voorkomen bij gebruik als profylaxe. Daarnaast kan dit onderzoek meer inzicht geven in de eigenschappen die een antiviraal middel moet hebben om effectief de multiplicatie van het dengue virus te onderdrukken.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek naar door muggen overdraagbare virale infecties, inclusief dengue, en de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor de dengue infectie en voor de PK studies, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor dengue infectie, het vergelijkbare verloop van de infectie en pathogenese en de zeer grote fysiologische en anatomische overeenkomsten met de mens. 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 (positive reinforcement). 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. De te onderzoeken antivirale middelen zijn in gevorderde stadia van ontwikkeling. De kandidaat medicijnen zijn tevoren gekarakteriseerd in *in vitro* en *in vivo* (veelal knaagdieren) modellen. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling is het echter noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid te onderzoeken in een diermodel waarin de aard en verloop van de ziekte, alsmede de mogelijke interactie tussen kandidaat antiviraal middel en de organen/weefsels, grote overeenkomsten vertonen met de mens. De effecten van de kandidaat antivirale middelen kunnen in dit diermodel goed worden onderzocht en ook kunnen eventuele nadelige effecten aan het licht komen.

Gezien het bovenstaande 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, specificeer 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.



> 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

AVD5020020172884

Bijlagen

2

Datum 11 september 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 september 2017. Het gaat om uw project "Evaluation of prophylactic and therapeutic Intervention strategies against dengue virus infection". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5020020172884. 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 september 2017

Aanvraagnummer:

AVD5020020172884

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50200
Naam instelling of organisatie: Biomedical Primate Research Centre
Naam 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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

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 december 2017
Geplande einddatum: 30 november 2022
Titel project: Evaluation of prophylactic and therapeutic Intervention strategies against dengue virus infection
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van antivirale middelen tegen dengue virusinfecties
Naam DEC: 10.2.g
Postadres DEC: 10.2.g
E-mailadres DEC: 10.2.e

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.541,-
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: 7 september 2017

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172884



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
AVD5020020172884

Bijlagen

2

Datum 11 september 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 11 september 2017

Vervaldatum: 11 oktober 2017

Factuurnummer: 172884

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5020020172884	€ 1.541,00

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.



> 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
AVD5020020172884

Datum 29 september 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 8 september 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection" met aanvraagnummer AVD5020020172884. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

De NTS die u heeft gestuurd is langer dan ongeveer 500 woorden en bij de 3V's worden teksten herhaald. Kunt u een nieuwe NTS sturen die korter is en daarnaast beter aansluit bij de handelingen zoals beschreven in de aanvraag? De handelingen aan de dieren zijn meer dan nu onder 3.4 beschreven.

Onduidelijkheden

Kunt u een nieuwe Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 sturen waarin u onder L ook aangeeft waarom de dieren gedood worden?

Kunt u daarnaast aangeven waarom u voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 niet verwacht dat de dieren de humane eindpunten zullen bereiken en voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 alle dieren?

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. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum:

29 september 2017

Aanvraagnummer:

AVD5020020172884

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting



Melding bijlagen

U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg altijd deze Melding Bijlagen toe.
Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
Meer informatie vindt u op www.centralecommissiedierproeven.nl
Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Biomedical Primate Research Centre

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD5020020172884

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?
Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

29 september 2017

Aanvraagnummer:

AVD5020020172884

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

Geachte mevrouw, heer,

Naar aanleiding van uw verzoek om aanvullende informatie betreffende onze aanvraag projectvergunning Dierproeven, AVD5020020172884, stuur ik u de gevraagde aangepaste documenten.

De volgende aanpassingen zijn gedaan:

- De NTS is ingekort en herschreven
- De handelingen beschreven onder 3.4 van de NTS zijn uitgebreider beschreven
- Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 (Appendix 3), sectie L, is nu ingevuld. Bij het overzetten van de draftversie naar de definitieve aanvraag is dit over het hoofd gezien. Mijn excuses hiervoor.
- Het humane eindpunt zoals weergegeven in Bijlage 3.4.4.1 (Appendix 1) is aangepast. Ook hier is bij het overzetten van de draftversie naar de definitieve aanvraag een fout gemaakt. Ook hiervoor mijn excuses.

Ik hoop dat ik de documenten naar tevredenheid heb ingevuld en zie uw reactie graag tegemoet



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Ontwikkeling van antivirale middelen tegen dengue virusinfecties
1.2 Looptijd van het project	1 december 2017 – 1 december 2022
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Antivirale middelen, dengue virus, effectiviteit, apen

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Dengue is een door muggen overgedragen virusinfectie die gepaard gaat met ernstige griepachtige verschijnselen, en is in een deel van de patiënten levensbedreigend. Meer dan 2,5 miljard mensen lopen het risico op dengue. Jaarlijks zijn er 390 miljoen dengue-infecties wereldwijd, waarvan 100 miljoen resulteren in ziekteverschijnselen. Per jaar resulteert dit in een half miljoen ziekenhuisopnames en 25 duizend sterfgevallen.</p> <p>Antivirale middelen tegen dengue zijn nog niet beschikbaar. Het doel van dit project is om antivirale middelen te testen die kunnen worden gebruikt om dengue virusinfecties te voorkomen (profylactisch gebruik), of te genezen (therapeutisch gebruik).</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Het uiteindelijke doel van dit project is de ontwikkeling van antivirale middelen tegen het dengue virus. Bij profylactisch gebruik kunnen deze bescherming bieden tegen dengue virusinfecties die worden opgelopen tijdens (kortdurende) bezoeken aan dengue-gebieden. Therapeutisch gebruik van deze middelen zal het mogelijk maken om dengue virusinfecties te genezen, of om ernstige ziekteverschijnselen of overlijden te voorkomen. |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | 316 resusapen |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | De dieren ondervinden licht ongerief door de biotechnische handelingen, zoals verdovingen, bloedafnames, en het toedienen van antivirale midde en. Tijdens de infectie studies worden de dieren dagelijks verdoofd en dit veroorzaakt matig ongerief. Na de virusinfectie kunnen de dieren ziek worden. Dit zal gedurende korte tijd licht tot matig ongerief veroorzaken. |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | De maximale welzijnsaantasting zal matig zijn. |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Maximaal 298 dieren zullen worden geethanaseerd na virusinfectie. De overige dieren deel kunnen blijven uitmaken van de experimentele kolonie op het instituut. |

4 Drie V's

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4.1 Vervanging
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | Voor dit preklinisch onderzoek zijn makaken het meest geschikt vanwege de grote gelijkenis van hun immuunsysteem, metabolisme, en fysiologie met dat van de mens, en vanwege het feit dat makaken, in tegenstelling tot muizen, een dengue infectie doormaken die het meest overeenkomt met die in de mens. Dit maakt een optimale vertaling van bevindingen naar de mens mogelijk. |
| 4.2 Vermindering
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. | Antivirale middelen worden pas getest in makaken na uitvoerige testen in het celkweken en in muizen. Alleen de meest veelbelovende middelen zullen in apen worden getest op werkzaamheid tegen dengue.

Per experiment wordt, in overleg met statistici, bepaald wat de optimale groepsgrootte is in de studies, zodat de onderzoeksvraag kan worden beantwoord met een minimaal aantal proefdieren. In de farmacokinetiek studies zullen meerdere doseringen worden getest in hetzelfde dier waardoor het totale aantal dieren in deze studies zo beperkt mogelijk zal zijn. |
| 4.3 Verfijning
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen | Er is gekozen voor makaken omdat deze dieren wat betreft hun lichaamsbouw, metabolisme van medicijnen en afweersysteem het meest op de mens lijken. Ook is een dengue infectie in makaken vergelijkbare met de infectie in de mens. Omdat makaken ook een natuurlijke gastheer |

diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

zijn voor het denguevirus, kunnen zij op vergelijkbare wijze worden geïnfecteerd en is het verloop van de infectie vergelijkbaar met die in de mens. In apen is de kans daarom het grootst dat eventuele onverwachte nadelige effecten alsnog opgespoord kunnen worden, en kan een goede voorspelling gedaan kan worden wat betreft werkzaamheid bij de mens.

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

De dieren worden getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan de handelingen. Alle handelingen worden uitgevoerd onder verdoving, en indien nodig wordt pijnstilling gegeven.

Dengue infecties in makaken verlopen in het algemeen mild. Als een dier ziek wordt zal dit direct aan een dierenarts worden gemeld. Indien nodig zal een passende behandeling worden gestart. Bij ernstige ziekte wordt een dier direct uit studie genomen en zal het op humane wijze worden gedood om verder ongerief te voorkomen.

Om de dieren zo veel mogelijk natuurlijk gedrag te laten vertonen is een uitgebreid programma voor diertraining en kooiverrijking opgezet.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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 | Dengue virus infection of nonhuman primates |

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.

In order to evaluate the efficacy of an antiviral compound, it is necessary to have a well-defined dengue virus infection model. Previously, we have established a model for infection of macaques with a serotype 2 dengue strain. However, for new dengue viruses, dengue serotypes, or virus stocks that have not yet been tested at our institute, it is necessary to thoroughly characterize the viral kinetic profile in macaques before they can be applied in dengue antiviral compound efficacy evaluation studies. **The main objective is to obtain an infection model with high similarity to human infection that is sufficiently robust to allow adequate evaluation of the effectiveness of antiviral compounds, in terms of reduction or prevention of virus replication.**

In general, the study set-up is as follows: a group of animals will be infected and monitored for clinical symptoms, fever, body weight and changes in blood parameters. Blood samples will be collected at regular time points to determine if the animals have become infected and what the amount of virus production is. To evaluate a new virus, or viral inoculum, the virus is inoculated using a standard dose.

The **primary outcome parameters** for dengue virus infection are:

1. the peak viral load (PVL)
2. time-point of start of viremia, and
3. the number of infected animals per inoculum dose.

Secondary outcome parameters for dengue virus infection that will be evaluated are the:

1. viral RNA load over time,
2. duration of viremia, and
3. total amount of virus produced during viremia (AUC; area under the curve)

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

At the start of the study, the animals will be infected by intravenous, intradermal, or subcutaneous inoculation. Experimental infection using different numbers of dengue virus-infected mosquitoes may also be explored as the natural way of human dengue infection. At the same time, blood is collected for a zero-value determination. 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. Typically, after infection of the animals, blood will be collected daily for a period of maximally 14 days to monitor the progress of the viral infection and to control for changes in clinical chemistry and hematology parameters. This intensive sampling is necessary because in this period significant and rapid changes in the amount of virus in the blood may occur. During this period of daily sampling the animals will be given tube feeding because the daily anesthesia has a negative influence on the appetite of the animals. In this way, the wellbeing of the animals is affected as little as possible. After this period, the frequency of blood collection will be brought down to maximally once every two days. After the animals have become virus-negative in the PCR for the first time, they may be followed for 2-3 weeks to confirm absence of the virus and to monitor for potential re-activations of virus replication. Thus, the length of an infection study will be maximally 5 weeks. At the end of the study, the animals will be humanely euthanized and necropsy will be performed for the collection of tissue samples for histopathological and virological tests. The latter will be done to investigate tissue and organ distribution of the virus, and to identify potential viral reservoirs. Viral reservoirs may contribute to virus re-activation, and are therefore of particular interest as targets for antiviral compounds. The details of each study, regarding the route of infection, dose used, etc., will be submitted for approval 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.

Presently, no or limited data are available regarding infection of rhesus macaques with low inoculum doses, as well as on the variation in viremia in macaques caused by different DENV serotypes in macaques. Therefore, no statistical calculations can be made regarding the number of animals needed in the infection studies. The group size is based on experience in flavivirus infection models, including DENV. We expect that with this number of animals, an adequate assessment can be made regarding the reproducibility of infection (all animals need to show virus replication), and on the variation in viremia, as measured in plasma. On the basis of the data from the experimental infections, a power calculation can be made about the number of animals needed in an antiviral compound evaluation study.

B. The animals

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

The experiments will be performed in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) n = 90. All rhesus macaques are purpose bred at our institute, or incidentally they will be obtained from a certified supplier in compliance with EU legislation. Both mature male and female animals can be used.

Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are highly susceptible to DENV infection and best mimic dengue virus infection and pathogenesis in humans (1-11). Additionally, their body weight allows the collection of relatively large blood volumes. This is crucial for experimental infection studies as the monitoring of viremia necessitates daily sampling for an extended period. For these reasons, rhesus macaques are the species of choice for the infection studies described here.

For each virus, or virus stock, we will test different inoculum doses in order to identify the inoculum that results in an optimal infection rate, a high peak viremia, in combination with an onset of viremia similar to that in humans, i.e. 3-7 days. A group size of six animals per inoculum is chosen because this will provide us with a reasonable estimate of the variability in infection rate and viremia for the different inocula. From the infection studies using different doses, an inoculum dose will be selected for use in antiviral efficacy studies.

The selection of the inoculum dose depends on the combination of the three primary outcome parameters: the PVL, onset of viremia, and number of infected animals. A thorough characterization of the inoculum is key to the antiviral compound efficacy studies, as a 1 log drop of the PVL under treatment versus vehicle is considered a biological relevant effect in the efficacy studies, and the

standard deviation (SD) value obtained in viral titration study directly influences the number of animal needed in the experimental groups (See Appendix 3, section 2A).

Therefore, a second, independent, infection study is planned, using the selected inoculum dose, to in-depth characterize the inter-animal variability of the selected inoculum in a larger animal sample size. In a period of 5 years we expect to test a maximum of three viral stock preparations. For each, we anticipate to test maximally 4 doses per viral stock, using 6 animals per group. In total, maximally 3 viral stocks x 4 doses x 6 animals = 72 animals will be used for the infection studies. For further analysis of the inter-animal variability using the selected inoculum dose we calculate maximally 6 animals per inoculum. Thus, an additional maximal number of 18 animals (3 viral stocks x 1 selected dose x 6 animals) are planned for these studies.

References

1. Angsubhakorn, S., Moe, J. B., Marchette, N. J., Latendresse, J. R., Palumbo, N. E., Yoksan, S., & Bhamarapavati, N. (1987). Neurovirulence detection of dengue virus using rhesus and cynomolgus monkeys. *Journal of Virological Methods*, 18(1), 13-24.
2. Bente, D. A., & Rico-Hesse, R. (2006). Models of dengue virus infection. *Drug Discovery Today Disease Models*, 3(1), 97-103.
3. Clark, K., Onlamoon, N., Hsiao, H.-M., Perng, G., & Villinger, F. (2013). Can non-human primates serve as models for investigating dengue disease pathogenesis? *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-17.
4. Freire, M. S., Marchevsky, R. S., Almeida, L. F. C., Yamamura, A. M. Y., Caride, E. C., Brindeiro, P. A., et al. (2007). Wild dengue virus types 1, 2 and 3 viremia in rhesus monkeys. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(2), 203-208.
5. Guy, B., Barban, V., Mantel, N., Aguirre, M., Gulia, S., Pontvianne, J., et al. (2009). Evaluation of interferences between dengue vaccine serotypes in a monkey model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(2), 302-311.
6. Halstead, S. B. (1979). In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *The Journal of Infectious Diseases*, 140(4), 527-533.
7. Halstead, S. B., & Shotwell, H. (1973). Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. II. Clinical laboratory responses to heterologous infection. *Journal of Infectious Diseases* 123(1), 15-22.
8. Marchette, N. J., Halstead, S. B., & Falkler, W. A. (1973). Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. III. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *Journal of Infectious Diseases*, 128(1), 23-30.
9. Onlamoon, N., Noisakran, S., Hsiao, H. M., Duncan, A., Villinger, F., Ansari, A. A., & Perng, G. C. (2010). Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood*, 115(9), 1823-1834.
10. Putnak, R., Fuller, J., VanderZanden, L., Innis, B. L., & Vaughn, D. W. (2003). Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(4), 469-476.
11. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 4(12), 62-82.

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.

Animals that will be used in these experiments, might have been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous flavivirus studies or that have pre-existing antibodies against flaviviruses are not suitable because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the 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

Several animal species, primarily rodents and nonhuman primates have been used to study dengue virus infection. Of these different species, NHPs have the advantage that they physiologically and immunologically most closely resemble humans. This has important implications, both for antiviral compound evaluation as well as for the interaction of the host with dengue virus, since these are affected both by the physiology and by the reaction of the innate and adaptive immune system. The proper evaluation of the antiviral compounds requires adequate infection models in NHP, which is the purpose of the studies proposed here.

Reduction

This animal procedure involves the development of a dengue infection model in rhesus macaques for use in antiviral compound efficacy testing. Because of the expected variability in viral replication kinetics between different viral strains or stocks, no statistical support for the number of animals can be provided at this point. Based on the extensive experience with other viral infection models within the institute where this research will be performed, plus the limited experience with dengue infection in NHP and based on available literature, we expect that six animals per group will be sufficient in the first experiment. On the basis of the outcome of the first study the number of animals needed in follow up experiments can be calculated and less animals may be needed. Only the minimum number of animals needed will be used.

Refinement

Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Infection and bleeding take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or virus infection. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.

All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the 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 dengue-related disease like (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma).

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute. During the studies animals will be observed daily by qualified animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool, they will be documented, and a veterinarian will be informed. Then, if necessary, measures will then be taken. All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relief the pain, if necessary. During the first 2 weeks of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.

The studies will be performed according the Dutch laws, and will cause no 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.

In case of symptoms caused by dengue virus infection, this can result in pain. For this purpose, oral or parenteral analgesia will be administered after consultation with the veterinarian.

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 virus infection
2. Stress because of recovery from sedation
3. Reduced food intake due to repeated sedations

Explain why these effects may emerge.

1. Intradermal infection can cause mild irritation
2. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling and virus infection. Nausea and disorientation can sometimes be observed during recovery from the sedation.
3. Animals will be sedated daily during the first phase of the infection. This will have influence of the

appetite

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

1. If irritation occurs, this will be mild. It will therefore not be necessary to take additional measures.
2. Recovery of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
3. Animals will receive tube feeding via gavage. This is applied during sedation.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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

In humans, approximately 10% of the dengue infections is clinically relevant. Clinical symptoms are very diverse and so far, there is no biomarker to predict the course of disease in advance. Several dengue infection studies have been described in macaques, and few clinical symptoms related to DENV infection have been described. Behavioural changes and some clinical signs have been recorded (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma), but none of these signs has been linked to serious DENV disease in macaques. The general condition of the animals will be monitored and registered in a dengue-customized clinical scoring list. If any of these symptoms is found, animal caretakers will directly contact the investigator and veterinarian. Together with all available information (haematology, clinical chemistry, general behaviour, additional clinical scoring and virological status) the veterinarian will judge the overall condition of the animal and will suggest the required follow up.

In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, the animal will be humanely euthanized at an earliest time point.

Indicate the likely incidence.

After DENV infection each animal may become seriously ill. Thus, the percentage is 100%

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 is estimated as moderate. This is mainly caused by the daily sedations after dengue virus infection.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

In order to investigate the presence of residual virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage caused by DENV, it is necessary to euthanize the animals

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 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 |
|---------------|----------------------------------------------------|
| 3 | DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates |
- 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.

In order to evaluate the use of an antiviral compound to prevent dengue virus infection, we will use the following study set-up: a group of animals will be administered the compound. Then, the animals will be experimentally infected with dengue virus (as defined in Appendix 1), and blood samples are collected at regular time points to determine if the animals have been protected against infection, or if the viremia is influenced by the prophylactic administration of the compound. A group of animals will not receive the compound, and will be used as controls.

When a compound is evaluated for its therapeutic potential, i.e. to cure infection, animals will first be infected with dengue virus, and subsequently the compound will be administered. During the study, blood is collected at regular time points and tested for the presence or absence of virus.

The **primary outcome parameter** for antiviral efficacy will be the peak viral load (PVL).

Other, secondary outcome parameters for dengue virus infection that will be evaluated are:

1. the viral RNA load,
2. the duration of viremia,
3. the total amount of virus produced during viremia (AUC; area under the curve)

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

Prophylactic antiviral study:

At the start of the study, the animals will be administered the antiviral compound. The route of administration and the dosage used are based on a PK study with this compound performed in rhesus macaques (Appendix 2). At the same time blood is collected for a zero-value determination. Then, the animals are experimentally infected. The optimal route and inoculum dose are determined in an infection study with this inoculum in rhesus macaques (Appendix 1). At that time point, a group of animals that did not receive the compound will also be infected, and will act as untreated controls in the study. Typically, after infection of the animals, blood will be collected daily for a period of maximally 14 days to monitor the progress of the viral infection and to control for changes in clinical chemistry and hematology parameters. This intensive sampling is necessary because in this period significant and rapid changes in the amount of virus in the blood may occur in untreated animals. During this period of daily sampling the animals will be given liquid foods by means of a probe because the daily anesthesia necessitates fasting of the animals. In this way, the wellbeing of the animals is affected as little as possible. After this period, the frequency of blood collection will be brought down to maximally once every two days. After the untreated control animals have become virus-negative in the PCR for the first time, the groups may be followed for an extra period of 3-4 weeks to confirm absence of the virus and to monitor for sudden re-activations of virus replication in any of the animals. At the end of the study, maximally 6 weeks after the start, the animals will be humanely euthanized and necropsy will be performed for the collection of tissue samples for histopathological and virological tests. 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.

Therapeutic antiviral study:

The set-up of a therapeutic study using the antiviral compound is essentially similar to the prophylactic study. However, in such a study the animals are first infected and then treated with the antiviral compound.

The details of each study, regarding the route of infection, dose used, number of animals used, will be submitted for approval 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 statistical analysis for the NHP efficacy studies will focus on the peak viral load (PVL) value, which is calculated from the dengue virus infection studies (appendix 1). For PVL a 1 log drop (on log₁₀ scale) under treatment versus vehicle is considered a biological relevant effect.

The design, and more specifically the sample size, of the study will aim to have a minimum of 80% power for detecting this relevant biological effect. Next to the size of the biological effect of interest also the variability in the data drives the required sample size. The true underlying standard deviation (SD) value is currently unknown and will be estimated based on the pilot viral titration study.¹

Currently we work under the assumption of two potential scenarios, the first where the SD is 0.5 and the second where the SD is 1. For these two scenarios a formal power calculation² was performed where the necessary sample size as function of variability and biological effect was assessed under the following assumptions:

- 80% power and 5% type I-error
- One sided testing since we are specifically looking for a directional effect
- 2 group comparison: placebo versus one active dose
- 1:1 randomization ratio between vehicle and active treatment group
- Common variability between the two groups
- Two sample T-test type analysis.

The result is a planned total sample size of 20 or 26 animals for respectively an anticipated scenario with SD of 0.5 and with SD of 1. The actual sample size will be revisited once the viral titration study¹ is finalized where we aim to reliably quantify the actual between animal variability of the parameter of interest and if it changes in function of inoculum used.

B. The animals

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

The experiments will be performed in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) n = 208. All rhesus macaques are purpose bred at our institute, or incidentally they will be obtained from a certified supplier. Both mature male and female animals can be used.

Currently, only two animal models are used in dengue virus research. Mouse models are used in DENV research to investigate various aspects of DENV pathogenesis. However, a major drawback of these rodent models is that the dengue virus infection is done via the highly artificial intracranial route, and that resultant virus replication is low. In contrast, nonhuman primates are the only natural vertebrate hosts besides humans that are susceptible to infection with the four dengue serotypes. Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) are highly susceptible to DENV infection and best mimic dengue virus infection and pathogenesis in humans (1-11). Additionally, in contrast to other animal species that are used in dengue research, i.e. rodents, macaques have the great advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly (12-14). The latter features, in combination with the susceptibility to DENV infection and the similarity of viremia to the human infection, renders the rhesus macaque an important preclinical animal model, and our animal model of choice, to investigate the efficacy of potential anti-DENV compounds for human use. Furthermore, the body weight of macaques allows the collection of relatively large blood volumes. This is crucial for the antiviral efficacy studies, as the monitoring of viremia necessitates daily sampling for an extended period.

The study design will be a two-stage design where in the first part 10 animals out of N (being either 20 or 26 depending on scenario given in A.) will be randomized to vehicle and highest dose group to be studied in a 1:1 ratio. After completion of this treatment part, an interim analysis will be performed to estimate the drug effect and test for its significance. The second stage will depend on the results of the first with the following potential scenarios:

1. Significant treatment effect detected: the remaining N-10 animals are randomized into the vehicle, highest dose group and minimum two new dose groups to allow estimation of underlying dose response pattern,
2. Estimated treatment effect ≥ 1 log₁₀ drop but not statistically significant: randomize extra X animals into vehicle and highest dose group and randomize the remaining (N-10-X) into minimum two new dose groups to allow estimation of underlying dose response pattern,
3. Estimated treatment effect < 1 log₁₀ drop and not statistically significant: randomize remaining animals into the vehicle and highest dose group to increase precision of estimated treatment effect or, if other study data allow it, randomize the remaining animals into vehicle and a higher dose group than originally planned.

If the power calculation on basis of the results obtained in the first stage of the study indicates that no statistically significant results can be obtained in stage 2 with the addition of extra animals, this is seen as a 'no-go' for the second stage. The study will then be discontinued after the first stage.

Typically, an antiviral efficacy study consists of one control group of animals and one treatment group (max. 2 x 26 = 52 animals). In a period of 5 years we expect to test a maximum of two antiviral compounds, both in a prophylactic and a therapeutic efficacy study.

In total 208 animals are the maximum needed for the efficacy studies over a period of 5 years. (2 compounds x 2 efficacy studies x 52 animals)

References:

1. Angsubhakorn, S., Moe, J. B., Marchette, N. J., Latendresse, J. R., Palumbo, N. E., Yoksan, S., & Bhamarapravati, N. (1987). Neurovirulence detection of dengue virus using rhesus and cynomolgus monkeys. *Journal of Virological Methods*, 18(1), 13-24.
2. Bente, D. A., & Rico-Hesse, R. (2006). Models of dengue virus infection. *Drug Discovery Today Disease Models*, 3(1), 97-103.
3. Clark, K., Onlamoon, N., Hsiao, H.-M., Perng, G., & Villinger, F. (2013). Can non-human primates serve as models for investigating dengue disease pathogenesis? *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-17.
4. Freire, M. S., Marchevsky, R. S., Almeida, L. F. C., Yamamura, A. M. Y., Caride, E. C., Brindeiro, P. A., et al. (2007). Wild dengue virus types 1, 2 and 3 viremia in rhesus monkeys. *Memórias Do Instituto*

- Oswaldo Cruz*, 102(2), 203–208.
5. Guy, B., Barban, V., Mantel, N., Aguirre, M., Gulia, S., Pontvianne, J., et al. (2009). Evaluation of interferences between dengue vaccine serotypes in a monkey model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(2), 302–311.
 6. Halstead, S. B. (1979). In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *The Journal of Infectious Diseases*, 140(4), 527–533.
 7. Halstead, S. B., & Shotwell, H. (1973). Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. II. Clinical laboratory responses to heterologous infection. *Journal of Infectious Diseases* 123(1), 15–22.
 8. Marchette, N. J., Halstead, S. B., & Falkler, W. A. (1973). Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. III. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *Journal of Infectious Diseases*, 128(1), 23–30.
 9. Onlamoon, N., Noisakran, S., Hsiao, H. M., Duncan, A., Villinger, F., Ansari, A. A., & Perng, G. C. (2010). Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood*, 115(9), 1823–1834.
 10. Putnak, R., Fuller, J., VanderZanden, L., Innis, B. L., & Vaughn, D. W. (2003). Vaccination of rhesus macaques against dengue-2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(4), 469–476.
 11. Zompi, S., & Harris, E. (2012). Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses*, 4(12), 62–82.
 12. Itoh, Y. (2016). Translational research on influenza virus infection using a nonhuman primate model. *Pathology International*, 66, 132–141.
 13. Clemons, D.J., Meador, V., Weinbauer, G.F., and Wakefield, G.A. (2012) Safety and Efficacy Evaluation Using Nonhuman Primates. In: *Nonhuman Primates in Biomedical Research vol.2* Academic Press
 14. Chih-Ming, L., Faggoni, R., and Roskos, L.K. (2015) Pharmacokinetics of human therapeutics characterized in nonhuman primates. In: *The Nonhuman Primate in Nonclinical Drug Development and Safety Assessment*. Academic Press

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.

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous flavivirus studies or that have pre-existing antibodies against flaviviruses are not suitable because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the 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

Although animal models for dengue infection other than nonhuman primates (NHP) are also in use in research for DENV, NHP are the animal model that best mimic infection and pathogenesis in humans. Equally, in contrast to other animal species that are used in biomedical research, like rodents, macaques have the great advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly. This, in combination with the fact that DENV infection of macaques, mimics infection and pathogenesis in humans, renders the rhesus macaque preclinical animal model of choice to investigate the efficacy of potential anti-DENV compounds for human use.

Reduction

This study involves the efficacy testing of antiviral compounds in the dengue virus infection model in rhesus macaques. Because the variability in dengue viral replication kinetics in the macaques will only become available after the completion of the infection studies, the exact number of animals to be used in the studies cannot be provided at this point. Under A we have described the statistical analyses that will be performed on basis of the infection studies. Only the minimum number of animals needed will be used. If possible, studies will be combined. In such a case, one control group will suffice and the total number of animals will be reduced.

Refinement

Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Infection and bleeding take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or virus infection. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.

All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the digital database at the institute. For the experiments, a standard clinical scoring form (behaviour, appetite and stool) will be extended for clinical signs that may be indicative of dengue-related disease like (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma).

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

Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute.

All experimental procedures will be performed under sedation using ketamine. Each time an animal is sedated, the animal will be weighed, the body temperature will be taken, and the animal will be closely examined. Our institute uses a customized database that documents all individual animals in the institute. General observations like behaviour, appetite and stool are part of this database. This database thus facilitates early recognition of minor changes in these general parameters. During the study, care will be taken to avoid pain. In case an animal suffers from pain, a veterinarian will be informed, and the animal will receive analgesics to relieve the pain, if necessary.

During the first 2 weeks of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.

Regular analysis of haematological and clinical chemistry parameters is part of the experiment. During these experiments, the virus load in plasma will also be analysed as primary indicator of infection. These data will also be consulted to determine if changes in behaviour, appetite or stool are clinically relevant. If necessary, judged by the veterinarian, measures will then be taken to treat the animal.

The studies will be performed according the Dutch laws, and will cause no 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?

X 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?

X 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.

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

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

X Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

In case of symptoms caused by dengue virus infection, this can result in pain. For this purpose, oral or parenteral analgesia will be administered after consultation with the veterinarian.

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 virus inoculation
2. Stress because of sedation
3. Reduced food intake due to repeated daily sedations

Explain why these effects may emerge.

1. Intradermal inoculation can cause mild irritation
2. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling and virus inoculation. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
3. Animals will be sedated daily during the first phase of the infection. This will have influence of the appetite

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

1. If irritation occurs, this will be mild. It will therefore not be necessary to take additional measures.
2. Recovery of the animals is monitored and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
3. Animals will receive tube feeding via gavage. This is applied during sedation for blood collection.

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.

In humans, approximately 10% of the dengue infections is clinically relevant. Clinical symptoms are very diverse and so far there is no biomarker to predict the course of disease on forehand. So far, several dengue infection studies have been described in nonhuman primates. So far, few clinical symptoms related to DENV infection in NHP have been described. Behavioural changes and some clinical signs have been recorded (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma), but none of these signs has been linked to serious DENV disease in macaques. The general condition of the animals will be monitored and registered in a dengue-customized clinical scoring list. If any of these symptoms is found animal caretakers will directly contact the investigator and veterinarian. Together with all available information (haematology, clinical chemistry, general behaviour, additional clinical scoring and virological status) the veterinarian will judge the overall condition of the animal and suggest required follow up.

In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, the animals will be humanely euthanized at an earliest time point.

Indicate the likely incidence.

After DENV infection each animal may become seriously ill. Thus, the percentage is 100%

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 is estimated as moderate

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 virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage caused by DENV, it is necessary to euthanize the animals

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



Datum 29-09-2017
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven
AVD20172884

Advies aan CCD

B

Instelling: Biomedical Primate Research Centre
Onderzoeker: 10.2.e
Project: Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection
Aanvraagnummer: AVD20172884
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categoriën: Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	<p>De aanvraag is inclusief DEC advies ontvangen.</p> <p>De aanvrager is gevraagd een nieuwe NTS te sturen die korter is en beter aansluit bij de handelingen beschreven in de aanvraag. Daarnaast is gevraagd voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 aan te geven waarom de dieren gedood worden. Tot slot is gevraagd waarom voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 geen van de dieren en voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 alle dieren de humane eindpunten zullen bereiken.</p>
---------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		90	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Niet menselijke primaten
3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		18	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Niet menselijke primaten
3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		208	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Niet menselijke primaten

Er wordt gebruik gemaakt van NHP (citaat):

Rhesus macaques (Macaca mulatta) are highly susceptible to DENV infection and best mimic dengue virus infection and pathogenesis in humans. Additionally, their body weight allows the collection of relatively large blood volumes. This is crucial for experimental infection studies as the monitoring of viremia necessitates daily sampling for an extended period. For these reasons, rhesus macaques are the species of choice for the infection studies described here.

Rhesus macaques are the species of choice for the PK studies described here. In contrast to other animal species that are used in dengue virus research, i.e. rodents, macaques have the advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly. This renders the macaque an important preclinical animal model to investigate the pharmacokinetics of potential anti-DENV compounds for human use.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.
- 3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates / Rhesusapen (Macaca mulatta): Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

- 3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates / 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	Er wordt verwacht dat het onderwerp in die mate politiek of maatschappelijk gevoelig is, dat eventuele extra communicatie uitingen nodig zijn. Het betreft onderzoek waar gebruik gemaakt wordt van apen.

2 DEC advies

DEC-advies	<p>citaten: De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor infectie met dengue virus en de grote gelijkenis met de mens wat betreft het verloop van de infectie en de pathogenese. Bovendien vertoont deze diersoort zeer grote fysiologische overeenkomsten met de mens, hetgeen van belang is voor drug metabolisme, farmacokinetiek en mogelijke interacties met de organen/weefsels. De kandidaat antivirale middelen zijn tevoren gekarakteriseerd qua werkzaamheid en toxiciteit in in vitro en in vivo (veelal knaagdieren) modellen. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling van kandidaat antivirale middelen is het echter noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid te onderzoeken in een diemodel waarin de aard en verloop van de ziekte grote overeenkomsten vertonen met de mens. De eventuele nadelige effecten (bijvoorbeeld als gevolg van de interactie met het infectieus agens en de organen/weefsels) van de kandidaat antivirale middelen kunnen in dit diemodel worden bepaald. Voor alle studies kunnen in principe dieren gebruikt worden die al eerder in een andere studie zijn gebruikt. Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.</p> <p>Hergebruik wordt altijd overwogen en ook nagestreefd (binnen de kaders omtrent dierenwelzijn en wetenschappelijke kwaliteit).</p> <p>Ethische afweging van de DEC: citaat: 1 Rechtvaardigt het testen van nieuwe kandidaat antivirale middelen tegen dengue 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 of andere onderzoeks modellen.</p> <p>2 De waarden voor de samenleving zijn gelegen in het ontwikkelen van antivirale middelen tegen dengue. Naar schatting raken jaarlijks 100 miljoen mensen geïnfecteerd met dengue. Bij een half miljoen mensen</p>
-------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

leidt de ziekte tot ziekenhuis opname en 25 duizend mensen overlijden ten gevolge van de ziekte. Er is één dengue vaccin beschikbaar dat echter niet even effectief is tegen alle serotypen. Er zijn nog geen antivirale middelen beschikbaar. Met een effectief antiviraal middel kan ziekte en sterfte en in bepaalde doelgroepen infectie voorkomen worden. De voordelen zijn zowel economisch (minder ziekte, minder zorgkosten) als bevorderlijk voor het algemene welzijn van de samenleving (minder doden, minder zieken).

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 in lichte mate ziek worden en enige pijn ondervinden door bloedafnames, injecties en infectie met dengue. De dieren ondervinden hiervan matig ongerief.

De waarden voor het onderzoeksveld zijn toenemend wetenschappelijk inzicht in de werking van potentiële antivirale middelen tegen dengue. Daarmee is dit onderzoek informatief en het is de uitdrukkelijke bedoeling om dit te publiceren.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van antivirale middelen die ernstige ziekte en sterfte ten gevolge van dengue infectie kunnen voorkomen. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

3 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 mensen, omdat het ontwikkelen van een effectief antiviraal middel tegen dengue met dengue geïnfecteerde mensen kan genezen en mogelijk infectie met dengue kan voorkomen bij gebruik als profylaxe. Daarnaast kan dit onderzoek meer inzicht geven in de eigenschappen die een antiviraal middel moet hebben om effectief de multiplicatie van het dengue virus te onderdrukken.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek naar door muggen overdraagbare virale infecties, inclusief dengue, en de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De gekozen strategie voor de dengue infectie en voor de PK studies, alsmede het management van dierenwelzijn, is mede gebaseerd op ervaringen uit deze eerdere studies. De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op bewezen gevoeligheid voor dengue infectie, het vergelijkbare verloop van de infectie en pathogenese

en de zeer grote fysiologische en anatomische overeenkomsten met de mens. 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 (positive reinforcement). 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. De te onderzoeken antivirale middelen zijn in gevorderde stadia van ontwikkeling. De kandidaat medicijnen zijn tevoren gekarakteriseerd in in vitro en in vivo (veelal knaagdieren) modellen. In de laatste fase van de preklinische ontwikkeling is het echter noodzakelijk om de effectiviteit en veiligheid te onderzoeken in een diemodel waarin de aard en verloop van de ziekte, alsmede de mogelijke interactie tussen kandidaat antiviraal middel en de organen/weefsels, grote overeenkomsten vertonen met de mens. De effecten van de kandidaat antivirale middelen kunnen in dit diemodel goed worden onderzocht en ook kunnen eventuele nadelige effecten aan het licht komen.

Gezien het bovenstaande 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

Enige tekstuele aanpassingen, aanvullende achtergrond informatie, verdere onderbouwing van de noodzaak om te testen in niet-humane primaten, nadere onderbouwing van het aantal benodigde dieren, nadere specificering van de primaire uitkomstparameters. Tevens werd gevraagd om aanvullende informatie over biotechnische handelingen, milieueffecten, verfijning en humane eindpunten.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	Het DEC-advies is volledig.
	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 en kan als grondslag dienen voor het besluit. De gestelde vragen zijn niet volledig weergegeven, maar het is wel duidelijk dat de informatie waar de DEC om gevraagd heeft, is verwerkt in de aanvraag.	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen- verstrengeling	Geen van de medewerkers van het Secretariaat heeft een arbeidsrelatie gehad met de aanvrager die minder dan 5 jaar geleden is beëindigd of heeft andere belangen die mogelijk zouden kunnen leiden tot oneigenlijke beïnvloeding.
Doelstelling Doelstelling	<p>citaat: The ultimate goal is to develop prophylactic and therapeutic intervention strategies for dengue virus infections in humans. The specific aim of this research project is to evaluate safety and efficacy of dengue antiviral compounds in rhesus macaques.</p> <p>Currently, no specific antiviral compounds are available for the treatment of Dengue virus (DENV) infections, or to be used as a prophylaxis. This research program contributes to the worldwide efforts to develop novel DENV antiviral compounds. Ultimately, after extensive in vitro testing, and in vivo evaluation in small animal models, antiviral compound safety and efficacy needs to be demonstrated in a suitable NHP species before they can be evaluated in clinical trials. The dengue antiviral compounds that will be tested at our institute in macaques will be in the final stages of their preclinical development, and require this last validation step In order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species, and that they are effective in animal species that have a drug metabolism and physiology closely resembling humans.</p>

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>citaat: The incidence of DENV worldwide has increased 30-fold over the last 50 years. It has been estimated by the WHO that 100 million clinically apparent dengue virus infections occur every year, resulting in 500.000 hospitalizations due to severe dengue, and 25.000 deaths. The rapid spread of DENV to new territories, and its potential to induce high morbidity and mortality in humans clearly shows the necessity for the development of vaccines, and to the requirement of antiviral compounds. Dengue virus vaccine development is hampered by a phenomenon known as 'antibody dependent enhancement' (ADE): infection by one of the four dengue virus serotypes confers lasting protection against homotypic re-infection, but a secondary infection with another serotype is associated with an increased risk of severe dengue disease. ADE is caused by antibodies that bind to the virus, but are incapable of neutralizing the virus. The challenge and difficulty in the development of a dengue vaccine is to avoid ADE elicited by vaccine-induced antibodies. Currently, there is only one dengue virus vaccine available which is directed to all 4 serotypes. For younger children, this vaccine is considered unsafe because of possible vaccine-induced ADE. Therefore, the vaccine is only recommended by the WHO for use in healthy individuals older than 9 years of age that live in endemic areas with high dengue virus burden.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>In het DEC-advies staat: Hoewel de ervaring met het dengue infectie model vrij beperkt is zijn kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven in grote mate aanwezig op het gebied van infectie van non-humane primaten met onder andere door muskieten overdraagbare virussen alsmede de aandacht voor de drie V's op dit gebied. Kennis en kunde worden verder onderbouwd door de wetenschappelijke output en de verworven interne- en externe financiering.</p> <p>Het secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

3V's

Vervanging

	<p>3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates: citaat: Several animal species, primarily rodents and nonhuman primates have been used to study dengue virus infection. Of these different species, NHPs have the advantage that they physiologically and immunologically most closely resemble humans. This has important implications, both for antiviral compound evaluation as well as for the interaction of the host with dengue virus, since these are affected both by the physiology and by the reaction of the innate and adaptive immune system. The proper evaluation of the antiviral compounds requires adequate infection models in NHP, which is the purpose of the studies proposed here.</p>
	<p>3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates: citaat: All compounds have been tested extensively for efficacy and toxicity in in vitro assays. Also, in vivo toxicity studies have been performed in rodents. Only when no side effects or signs of toxicity are found in the rodent model, the compounds will be evaluated in nonhuman primates.</p>
	<p>3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates: citaat: Although animal models for dengue infection other than nonhuman primates (NHP) are also in use in research for DENV, NHP are the animal model that best mimic infection and pathogenesis in humans. Equally, in contrast to other animal species that are used in biomedical research, like rodents, macaques have the great advantage that their body surface area/mass ratio, drug metabolism, pharmacokinetics, and anatomical structure are highly comparable to that of humans. As a consequence, drugs are metabolized in a similar way in macaques as in humans, and also exert their mode of action similarly. This, in combination with the fact that DENV infection of macaques, mimics infection and pathogenesis in humans, renders the rhesus macaque preclinical animal model of choice to investigate the efficacy of potential anti-DENV compounds for human use.</p>

Verminderen	<p>3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates: citaat: This animal procedure involves the development of a dengue infection model in rhesus macaques for use in antiviral compound efficacy testing. Because of the expected variability in viral replication kinetics between different viral strains or stocks, no statistical support for the number of animals can be provided at this point. Based on the extensive experience with other viral infection models within the institute where this research will be performed, plus the limited experience with dengue infection in NHP and based on available literature, we expect that six animals per group will be sufficient in the first experiment. On the basis of the outcome of the first study the number of animals needed in follow up experiments can be calculated and less animals may be needed. Only the minimum number of animals needed will be used.</p>
	<p>3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates: citaat: In this animal procedure, the pharmacokinetic profile of anti-dengue compounds is determined in rhesus macaques, before their use in antiviral compound efficacy testing in the same animal species. A group size of 3 animals is the standard group size for PK studies. From previous PK studies, it was concluded that experimental groups of three animals are sufficient to obtain a pharmacokinetic profile of the compounds in blood of macaques. This group size allows us insight in the variance between the individual animals, and at the same time allows us to identify possible outliers. Only the minimum number of animals needed, will be used.</p>
	<p>3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates: citaat: This study involves the efficacy testing of antiviral compounds in the dengue virus infection model in rhesus macaques. Because the variability in dengue viral replication kinetics in the macaques will only become available after the completion of the infection studies, the exact number of animals to be used in the studies cannot be provided at this point. Under A we have described the statistical analyses that will be performed on basis of the infection studies. Only the minimum number of animals needed will be used. If possible, studies will be combined. In such a case, one control group will suffice and the total number of animals will be reduced.</p>

Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates: citaat: Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Infection and bleeding take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or virus infection. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.</p> <p>All observations will be documented and registered in a clinical scoring form which is part of the 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 dengue-related disease like (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma).</p> <p>Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute.</p>
	<p>3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates: citaat: Supplementary nutritious and calorie-rich diet is administered (via a gavage) when the animals are daily sedated for blood sampling or compound administration. This eliminates the possible negative effects of fasting for the purpose of frequent sedation. Compound administration and blood sampling take place under sedation, and at the same time the animals will be weighed and examined. The animals are trained to work as much as possible voluntarily on invasive biotechnological actions such as giving anaesthesia or compound administration. In consultation with our collaborators, the number of blood samplings, and the collected volumes of blood are reduced to a minimum.</p> <p>Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for environmental enrichment in our institute.</p>
	<p>3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates: Zie Bijlage Dierproeven 3.4.4.1</p>
<p>Wettelijk vereist onderzoek Indien ja, is er sprake van herhaling?</p>	<p>Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.</p>

Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates: Animals that will be used in these experiments, might have been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous flavivirus studies or that have pre-existing antibodies against flaviviruses are not suitable because of the strong immunological cross-reactivity between the different flaviviruses. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.	
3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates: Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. In view of the long life of the animals of this species reuse of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.	
3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates: Zie Bijlage Dierproeven 3.4.4.1	

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates	Nee	
3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates	HEP: not expected	In humans, approximately 10% of the dengue infections is clinically relevant. Clinical symptoms are very diverse and so far, there is no biomarker to predict the course of disease in advance. Several dengue infection studies have been described in macaques, and few clinical symptoms related to DENV infection have been described. Behavioural changes and some clinical signs have been recorded (decreased activity, skin rash, petechiae, and subcutaneous hematoma), but none of these signs has been linked to serious DENV disease in macaques. The general condition of the animals will be monitored and registered in a dengue-customized clinical scoring list. If any of these symptoms is found, animal caretakers will directly contact the investigator and veterinarian. Together with all available information (haematology, clinical chemistry, general behaviour, additional clinical scoring and virological status) the veterinarian will judge the overall condition of the animal and will suggest the required follow up. In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, the animal will be humanely euthanized at an earliest time point.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: Matig	
3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates	HEP: not expected	It is not expected that animals will reach a humane endpoint due to the PK study. However, through intensive monitoring of the animals, deviations in behavior, appetite etc. will be noted quickly. In addition, the animals are weighed at each blood collection. A major weight loss of > 20% relative to the weight at the start of the study is seen as humane endpoint. In case an animal is seriously ill, as judged by the veterinarian, it will be humanely euthanized.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: Matig	

3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates	HEP: After DENV infection each animal may become seriously ill. Thus, the percentage is 100%	Zie Bijlage Dierproeven 3.4.4.1
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: Matig	

5 Samenvatting

Het projectvoorstel bevat voldoende informatie over het belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's, het ongerief en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen.

In dit project wordt gebruik gemaakt van NHP. Dieren worden indien mogelijk hergebruikt. Dit is volgens het secretariaat voldoende onderbouwd.

Met betrekking tot de farmacokinetiek: de PK wordt stapsgewijs opgezet en er worden steeds dezelfde apen gebruikt. De data van dosis 1 wordt gebruikt voor het bepalen van vervolgdosissen in de PK studies.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat volgt het DEC-advies, maar stelt voor aanvullende algemene voorwaarde(n) te stellen.

Het Secretariaat adviseert dit project toe te wijzen.

Voorstel is om de vergunning te verlenen van 1 december 2017 tot en met 30 november 2022.

Hierbij stelt het Secretariaat voor de volgende voorwaarden te stellen:

Voorwaarden

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

Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk november 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.

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

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

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.

7 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
AVD5020020172884
Bijlagen
1

Datum 13 oktober 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 8 september 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection" met aanvraagnummer AVD5020020172884. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 5 oktober 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe, kortere, NTS die beter aansloot bij de aanvraag; de reden van het doden van de dieren voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.3 en waarom het aantal dieren dat de humane eindpunten zal bereiken verschilt.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 december 2017 tot en met 30 november 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

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

In het project worden niet humane primaten gebruikt.

Datum:
13 oktober 2017
Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie 10.2.g gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 september 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze: 10.2.g

Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Biomedical Primate Research Centre
Adres: Postbus 3306
Postcode en plaats: 2288 GJ RIJSWIJK
Deelnemersnummer: 50200

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 december 2017 tot en met 30 november 2022, voor het project "Evaluation of prophylactic and therapeutic intervention strategies against dengue virus infection" met aanvraagnummer AVD5020020172884, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 8 september 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 september 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 5 oktober 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 september 2017, ontvangen op 8 september 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 5 oktober 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Dengue virus infection of nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	90	Matig	
3.4.4.2 Pharmacokinetics (PK) of DENV antiviral compounds in nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	18	Matig	
3.4.4.3 DENV antiviral efficacy study in nonhuman primates				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	208	Matig	

Voorwaarden

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

Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk november 2023

Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

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.

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

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



Aanvraagnummer:
AVD5020020172884

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:
AVD5020020172884

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.