

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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on 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'.

10.2.g

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

Serial number	Type of animal procedure
1	Establishment of a new influenza infection model in macaques

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 establish the capacity of a vaccine to protect against influenza virus infection it is necessary to have a well-defined influenza virus infection model. Previously we have established a model for infection of macaques with pandemic H1N1 and highly pathogenic avian H5N1 viruses (1, 2) (doi.org/10.3390/v13020235). For new influenza viruses that have not yet been tested at our institute it is necessary to establish infectivity and pathogenicity in macaques before they can be applied in influenza vaccine efficacy evaluation studies. The main objective is to obtain an infection model that is sufficiently robust to allow adequate evaluation of vaccine efficacy in terms of reduction in clinical symptoms, fever and virus multiplication. In cases viruses are used that are known to cause persistent lung pathology, this will also be a primary outcome parameter. In general, the study set-up is as follows: a small number of animals will be infected and monitored for clinical symptoms, fever, body weight and changes in blood parameters. Nasal and tracheal swabs will be taken to determine if the animals have become infected and determine the magnitude of virus multiplication. To evaluate a new virus, the virus is either inoculated by a combination of routes; for instance intra-bronchial, oral, intranasal and intraocular or by aerosol exposure using a standard dose. Proper application for vaccine evaluation requires that more than 80% of the animals become infected and that the amount of virus produced in the trachea over the infection period is clearly measurable and that the variation between the animals is sufficiently low to allow measurement of reduction in virus load in vaccinated animals with less than 10 animals per group. In case these parameters are not achieved then the experiment will be repeated with a 10-100 times higher dose. In case any of the animals reaches the clinical endpoint within the first four days after infection then a 10-100 times lower virus dose will be evaluated. The mode of exposure that will be tested will be identical to the method to be used in the vaccine evaluation study. Evaluation of new influenza viruses as described in this appendix is only performed when a vaccine evaluation study is already planned with the same virus.

Primary outcome parameters are:

Clinical symptoms, fever, virus multiplication.

Pathology in case viruses are used that are known to cause persistent lung pathology.

Secondary outcome parameters are:

Bodyweight, changes in leucocyte subset composition in peripheral blood.

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

Temperature and potentially activity and heart rate will be measured by telemetry. A device that records and transmits these parameters is surgically placed in the abdominal cavity at least 4 weeks before the infection. This time frame is necessary for full recovery of the animals and to allow adequate recording of body temperature and/or heart rate and activity during a two to three week period to establish normal values before infection. Influenza infection may be done by intra-bronchial or intra-tracheal inoculation alone or in combination with oral, intranasal and intraocular inoculation or via aerosol delivery using a nebulizer. Clinical symptoms will be monitored twice daily. Nasal and tracheal swabs will be taken before infection, frequently during the first days after infection (daily and then every other day) and subsequently less frequently until day 21, to measure virus multiplication in the upper airways. Lung lavages may be taken at selected time points (max 5 times) to measure virus multiplication in the lungs. Blood is taken simultaneously with the swabs, to monitor changes in clinical chemistry and haematology parameters and leucocyte subsets. At the same time points body weight and physiological parameters (for instance pulse rate, blood pressure) are recorded and imaging (for instance (PET-)CT scan) is performed to measure lung infiltration. After the virus is cleared (usually at day 21 after infection) animals are either returned to the experimental stock or they are humanely euthanized and a full necropsy is performed in order to establish lung pathology and virus multiplication in the different parts of the respiratory tract. Euthanasia is only performed when assessment of lung pathology is required in case pathogenic influenza viruses are used that are known to cause persistent lung pathology. However, when animals are not yet virus negative at day 21 an extra tracheal swab will be taken at day 28. When that is also virus positive, which is very unlikely, the animals will be euthanized in order to preclude further discomfort. In case an animal should reach the humane endpoint during the study it will be immediately humanely euthanized and a full necropsy will be performed to establish lung pathology and virus multiplication in the respiratory tract. In case animals are returned to the experimental stock the recording devices are surgically removed and body temperature and/or heart rate and activity data are analysed.

The details of each study, regarding the route of infection, dose used, species and whether animals are to be euthanized at the end of the study will be submitted for approval to the AWB.

Table. Maximum number of repeats per procedure.

Procedure	Maximum	Duration
Sedation	15	15-60 min
Recorder in/out	2	60 min
Blood sample	10	10 min
Bronchoalveola lavage (BAL)	5	30 min
Infection	1	10 min
Swabs	10	10 min
CT-scan	5	15 min

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

The initial experiment will be performed in four animals. Experience in the pandemic H1N1 and avian H5N1 influenza infection models have shown that with this number of animals an adequate assessment can be made on the reproducibility of infection (all 4 animals need to show virus multiplication in the trachea), the variability of virus production in the trachea and the amount of fever induction. On the basis of these data a power calculation can be made about the number of animals needed in a vaccine evaluation study. Should the result of these calculations be that more than 10 animals are needed per group or should not all four animals have become infected than a new experiment with 4 animals is needed with a higher virus dose. If also at a high virus dose the variation between the animals is still too high then it may be necessary to repeat the experiment in another macaque species

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Rhesus or cynomolgus macaque	Purpose bred	adult	24	M / F	no	Not applicable

Provide justifications for these choices

Species	Macaque species have been used in several influenza vaccine studies (1-6). The most frequently used species are the rhesus- (<i>Macaca mulatta</i>) and cynomolgus monkey (<i>Macaca fascicularis</i>). Both species are semi-permissive to influenza infection. Therefore, both rhesus and cynomolgus macaques can be used for influenza vaccine evaluation studies.
Origin	All animals are purpose bred. They are either bred at our institute or obtained from a certified supplier.
Life stages	Adult animals will be used because these allow larger volumes of blood to be collected.
Number	24 macaques in total (either cynomolgus or rhesus). The number of animals requested is based on the assumption that each study will comprise two challenge doses, with 4 animals per group. We anticipate to perform 3 such studies over a 5-year period.
Gender	Adult male and female animals can be used. Since there are immunological differences between males and females (7, 8), we prefer that for each individual experiment either all animals are male or all are female, in order to minimise the variation within the experimental test group, thereby increasing the probability of finding statistically significant differences between the experimental groups. This choice is also important with regard to the amount of blood needed to perform all assays. Male animals are usually larger than female animals and therefore more blood per time point can be drawn from males. In case assays need to be performed which consume large amounts of blood, male monkeys are preferred over females.
Genetic alterations	Not applicable
Strain	Not applicable

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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.

After placement of the recording device in the abdomen and after removal, which is needed in case the animal will not be euthanised after completion of the experiment, animals will receive analgesics for as long as necessary, typically 3 days. In previous studies we have observed that animals can experience some body temperature elevation during the first days after insertion of the recording device, but have recovered very well within 1 week after the operation. Pain relieve will also be applied when substantial induration is seen at the site of vaccine injection. In case of the latter, analgesics known not to interfere with the induction of the vaccine response will be used.

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

9. Discomfort because of insertion or removal of the temperature recording device
10. Discomfort due to lung lavages
11. Discomfort due to virus installation
12. Discomfort due to PET-CTs
13. Stress because of sedation and recovery
14. Reduced food intake during the first days after infection
15. Disease symptoms due to the infection

Explain why these effects may emerge.

9. The surgery needed for insertion and removal of the temperature recording device will cause pain and some local inflammation.
10. For the lung lavages a bronchoscope is used. Insertion will cause irritation.
11. When virus is given intra-bronchially a bronchoscope is used and this combined with the inoculum volume will cause irritation. Aerosol application implies that animals have to be sedated and forced to breathe via a nebulizer device and this can give irritation.
12. For the PET-CT animals are sedated, intubated and mechanical ventilation with a forced breathing pattern is applied. No adverse effects are expected from the scan itself
13. Animals will be repeatedly sedated for vaccine delivery, blood sampling, virus infection, collection of swabs, CTs and lung lavages. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
14. Especially during daily sedation during the first 2 days after infection food intake might be reduced.
15. Influenza infection can cause fever, coughing, sneezing, nose discharge, laboured breathing, increased breathing rate, loss of appetite, inactivity.

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

9. Surgery will be done under anaesthesia and after surgery analgesics will be applied.
10. For the lung lavages animals are first deeply sedated and then receive a local muscle relaxant.
11. The same procedure as described under 3 will be followed
12. The animals are first deeply sedated and then receive a local mucosal relaxant before intubation. The mechanical ventilation & forced breathing patterns will be monitored and adapted on each animals characteristics.
13. Recovery of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.
14. Animals will receive supportive feeding with dense "brokkenballen".
15. Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached then the animal will be humanely euthanized and a full necropsy will be performed to establish the cause of the disease and viral distribution over the respiratory tract.

E. 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 F

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

Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms (9). When a clinical score of 35 is reached this indicates that the maximum duration of severity is reached then the animal will be euthanized. Individual scores are added and the decision is based on the total daily score and veterinarian assessment of discomfort. Symptoms that lead to an immediate endpoint are: open mouth breathing or cyanosis, lethargy as defined by minimal response to human approach.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence for reaching a clinical endpoint depends on the virus strain that is used for infection. Human influenza viruses only rarely cause severe disease (<1% of the animals). Highly pathogenic avian influenza viruses can cause lethal disease in up to 75% of the non-vaccinated control animals.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

The total amount of discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the surgical implantation and removal of the recording device and development of disease due to infection.

G. 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	Due to the complex interaction of influenza virus with different tissues and the role of local immunity in eradication of the virus the efficacy of an influenza vaccine to protect against infection can only be adequately established in an animal infection model. Several animal species have been used to study influenza virus infection (10, 11). However, of these different species NHP have the advantage that they physiologically and immunologically most closely resemble humans. This has important implications, both for vaccine evaluation (explained in appendix 1), as well as for the interaction with influenza virus, since this is affected both by physiology and by the reaction of the innate and adaptive immune system. As explained in appendix 1, these aspects are especially important for the evaluation for "universal" influenza vaccines. The proper evaluation of these vaccines requires adequate infection models in NHP, which is the purpose of the studies proposed here.
Reduction	Experience from previous experiments has shown that when the virus is inoculated by a standard combination of routes at a standard dose, four animals per test group is sufficient in order to determine whether a suitable infection model has been achieved and to perform a power calculation to determine the number of animals needed in a vaccine evaluation study. In case the criteria, as outlined under A are not met, a second experiment may be needed with another dose or in another NHP species. Only the minimum number of animals required, will be used.

Refinement	<p>The use of recording devices enables the monitoring of body temperature, heart- and breathing-rate every 15 minutes. We have designed a method that allows very precise calculation of fever induction caused by influenza infection (1). With this method we have observed a significant reduction in fever by influenza vaccine candidates (5). Such precise measurements are not possible with the traditional rectal temperature measurement. Placement and removal of the temperature responders will require a small surgical procedure, which will be done under anaesthesia. Subsequently, animals will receive analgesics as long as required. Animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation. Animals will be socially housed with a socially compatible animal.</p> <p>There is an extensive program for enrichment in our institute that consists of playing material and methods to present food.</p> <p>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. During the infection animals will be observed twice daily and clinical symptoms will be scored using a well-established clinical scoring list adapted from Brining et al. (9). On the basis of the scoring system a humane endpoint is defined. In addition, a sudden strong decrease in body temperature is taken as a humane endpoint. When this endpoint is reached the animal will be immediately euthanized and a full necropsy will be performed to determine the cause of disease. 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 first 2 days of the infection the animal will receive supportive feeding with dense "brokkenballen". This is necessary, because animals have to fast the night before the sedation and since animals will be sedated daily during the first days after infection the food intake during this period would otherwise be very limited.</p>
------------	---

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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 influenza vaccine or influenza virus infection studies or that have pre-existing antibodies against influenza are not suitable. In view of the long life-span of the animals of this species re-use 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.

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable

J. 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 K.

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.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

In most studies the animals will be re-used after the virus is cleared (usually at day 21 after infection). However, in cases where possible adverse effects of the vaccine have to be studied animals are euthanized and a full necropsy is performed.

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 > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Euthanasia is done by injection of an anaesthetic dose of ketamine followed by an overdose of barbiturate intravenously

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

References

10.2.e

3. 10.2.e

10.2.e

10.2.e

4. 10.2.e

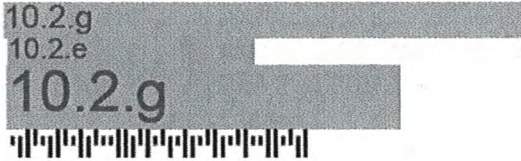
10.2.e

10.2.e

5. Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, Wagner MV, Zhu X, Hoffman RM, et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science*. 2015;349:1301-6.
6. van der Lubbe JEM, Huizingh J, Verspuij JWA, Tettero L, Schmit-Tillemans SPR, Mooij P, et al. Mini-hemagglutinin vaccination induces cross-reactive antibodies in pre-exposed NHP that protect mice against lethal influenza challenge. *NPJ Vaccines*. 2018;3(1):25.
7. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:626-38.
8. Klein SL, Marriott I, Fish EN. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;109(1):9-15.
9. Brining DL, Mattoon JS, Kercher L, Lacasse RA, Safronetz D, Feldmann H, et al. Thoracic radiography as a refinement methodology for the study of H1N1 influenza in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Comp Med*. 2010;60:389-95.
10. Bodewes R, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Animal models for the preclinical evaluation of candidate influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9(1):59-72.
11. Bouvier NM, Lowen AC. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses*. 2010;2(8):1530-63.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVC10.2.g 202114680
Bijlagen
2

Datum 11 maart 2021
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 maart 2021. Het gaat om uw project "Evaluation of novel influenza vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against influenza infection in macaques". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD10.2.g 202114680. 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, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Datum:

11 maart 2021

Aanvraagnummer:

AVD10.2.g 202114680

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:

10.2.g

Naam instelling of organisatie:

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

10.2.e

Straat en huisnummer:

10.2.g

Postbus:

Postcode en plaats:

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

10.2.e

Functie:

10.2.e

Afdeling:

Virology

Telefoonnummer:

10.2.g

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

10.2.e

Functie:

10.2.e

Afdeling:

Virology

Telefoonnummer:

10.2.e

E-mailadres:

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 juni 2021
Geplande einddatum: 31 mei 2026
Titel project: Evaluation of novel influenza vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against influenza infection in macaques
Titel niet-technische samenvatting: Evaluation of novel influenza vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against influenza infection in macaques
Naam DEC: 10.2.g
Postadres DEC: 10.2.g
E-mailadres DEC: 10.2.g

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.673,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

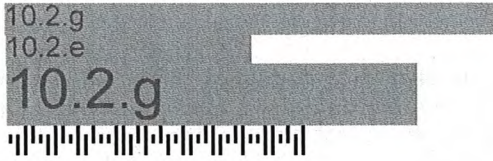
Ondertekening

Naam: 10.2.e
Functie: Adjunct Directeur
Plaats: 10.2.g
Datum: 11 maart 2021



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 10.2.g 02114680
Bijlagen
2

Datum 11 maart 2021
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 11 maart 2021
Vervaldatum: 10 april 2021
Factuurnummer: 2114680

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD 10.2.g 202114680	€ 1.673,00

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 te 's Gravenhage.

10.2.e

Van: 10.2.e namens Info-zbo
 Verzonden: woensdag 21 april 2021 15:51
 Aan: 10.2.e
 Onderwerp: RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114680

Goedemiddag 10.2.e,

Sorry voor de verwarring, ik heb niet duidelijk opgeschreven wat ik bedoel. In de bijlage "Establishment of a new influenza infection model in macaques" staat bij punt 1.3 bij serial number nummer 1 ingevuld. Omdat dit de tweede bijlage is moet dit nummer 2 zijn. Dit is puur administratief maar zorgt ervoor dat er geen verwarring in toekomstige communicatie over kan ontstaan.

Ik heb ter verheldering een plaatje meegestuurd welk nummer het betreft. Nummer 1 moet aangepast worden in nummer 2. Ik hoop dat het nu duidelijk is. Als dit niet het geval is dan hoor ik je graag.

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2.g

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Serial number

Type of animal procedure

1

Establishment of a new influenza infection macaques

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 7890789
 E: info@zbo-ccd.nl

Van: 10.2.e
 Verzonden: woensdag 21 april 2021 15:40
 Aan: info@zbo-ccd.nl; 10.2.e
 CC: 10.2.e 10.2.g
 Onderwerp: Re: Aanhouden AVD 10.2.g 202114680

Beste leden van de CCD,

Dank u wel voor de evaluatie van aanvraag AVD 10.2.g 202114680.

Het is mij niet geheel duidelijk waar ik bijlage 3.4.4.2. kan vinden. Er staat hieronder dan volgnummer 2 in plaats van 1 moet worden ingevuld, maar ik begrijp niet goed waar dat moet gebeuren. Betreft het de bijlages of de aanvraag projectvergunning? Kan ik u ander hier even over bellen?

Gr. 10.2.e

Van: <info@zbo-ccd.nl>

Beantwoorden - Aan: <info@zbo-ccd.nl>

Datum: woensdag 21 april 2021 om 11:21

Aan: 10.2.e

CC: 10.2.e 10.2.g

Onderwerp: Aanhouden AVD 10.2.g 202114680

Geachte 10.2.e,

Op 11-03-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel influenza vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against influenza infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114680. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

Er staat niet in de NTS beschreven wat het directe doel van uw onderzoek inhoudt. Wilt u dit in de NTS opnemen?

Onduidelijkheden

U geeft in u onderzoek aan om per studie 1 geslacht in te zetten om zo minder variatie te hebben, omdat er verschillen zijn tussen mannen en vrouwen. U voert echter translationeel onderzoek uit waarbij wordt gekeken naar effectiviteit en veiligheid van een vaccine. Gezien het translationele karakter van het onderzoek zou er worden verwacht dat er naar beide geslachten in 1 studie wordt gekeken. Kunt u onderbouwen waarom u per studie niet beide geslachten inzet?

U heeft in bijlage 3.4.4.2. als volgnummer 1 in plaats van volgnummer 2 ingevuld. Kunt u dit aanpassen?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

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

Met vriendelijke groet,

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

10.2.g

Van: 10.2.e
Aan: info-zbo
Onderwerp: Re: Aanhouden AVC 10.2.g 202114680
Datum: woensdag 21 april 2021 17:54:30
Bijlagen: image001.png

Bedankt voor uw antwoord. Ik had het inderdaad over het hoofd gezien. Ik zal de antwoorden spoedig indienen.

10.2.e

Van: 10.2.e namens Info-zbo

Datum: woensdag 21 april 2021 om 15:51

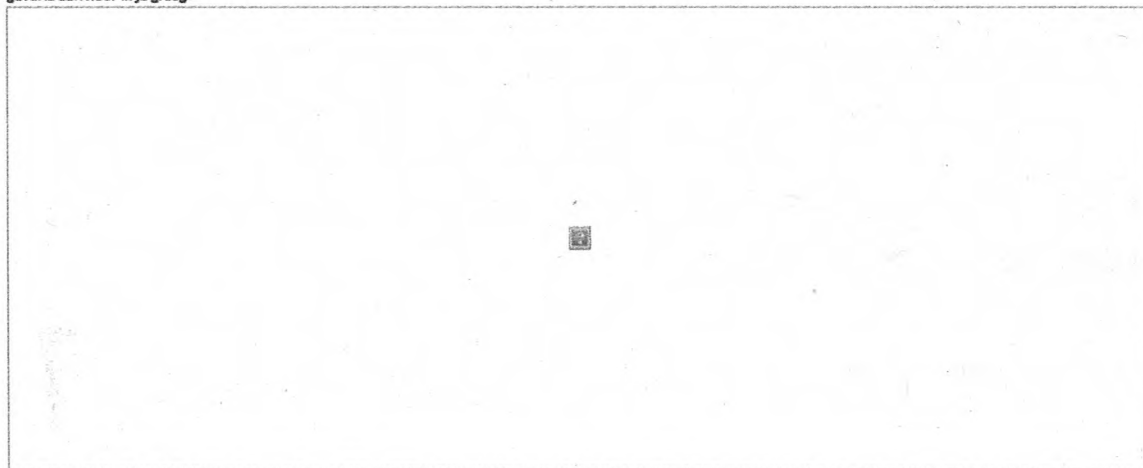
Aan: 10.2.e

Onderwerp: RE: Aanhouden AVC 10.2.g 202114680

Goedemiddag 10.2.e,

Sorry voor de verwarring, ik heb niet duidelijk opgeschreven wat ik bedoel. In de bijlage "Establishment of a new influenza infection model in macaques" staat bij punt 1.3 bij serial number nummer 1 ingevuld. Omdat dit de tweede bijlage is moet dit nummer 2 zijn. Dit is puur administratief maar zorgt ervoor dat er geen verwarring in toekomstige communicatie over kan ontstaan.

Ik heb ter verheldering een plaatje meegestuurd welk nummer het betreft. Nummer 1 moet aangepast worden in nummer 2. Ik hoop dat het nu duidelijk is. Als dit niet het geval is dan hoor ik je graag.



Met vriendelijke groet,

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 7890789
 E: info@zbo-ccd.nl

Van: 10.2.e

Verzonden: woensdag 21 april 2021 15:40

Aan: info@zbo-ccd.nl; 10.2.e

CC: 10.2.e 10.2.g

Onderwerp: Re: Aanhouden AVC 10.2.g 202114680

Beste leden van de CCD,

Dank u wel voor de evaluatie van aanvraag AVC 10.2.g 202114680.

Het is mij niet geheel duidelijk waar ik bijlage 3.4.4.2. kan vinden. Er staat hieronder dan volgnummer 2 in plaats van 1 moet worden ingevuld, maar ik begrijp niet goed waar dat moet gebeuren. Betreft het de bijlages of de aanvraag projectvergunning? Kan ik u ander hier even over bellen?

Gr. 10.2.e

Van: <info@zbo-ccd.nl>

Beantwoorden - Aan: <info@zbo-ccd.nl>

Datum: woensdag 21 april 2021 om 11:21

Aan: 10.2.e

CC: 10.2.e 10.2.g

Onderwerp: Aanhouden AVC 10.2.g 202114680

Geachte 10.2.e,

Op 11-03-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel influenza vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against influenza infection in macaques" met aanvraagnummer AVC 10.2.g 202114680. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

Er staat niet in de NTS beschreven wat het directe doel van uw onderzoek inhoudt. Wilt u dit in de NTS opnemen?

Onduidelijkheden

U geeft in u onderzoek aan om per studie 1 geslacht in te zetten om zo minder variatie te hebben, omdat er verschillen zijn tussen mannen en vrouwen. U voert echter translationeel onderzoek uit waarbij wordt gekeken naar effectiviteit en veiligheid van een vaccine. Gezien het translationele karakter van het onderzoek zou er worden verwacht dat er naar beide geslachten in 1 studie wordt gekeken. Kunt u onderbouwen waarom u per studie niet beide geslachten inzet?

U heeft in bijlage 3.4.4.2. als volgnummer 1 in plaats van volgnummer 2 ingevuld. Kunt u dit aanpassen?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

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

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.
The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

10.2.g

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.
The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

10.2.g

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

Aanvraagnummer: AVD^{10.2.g}202114680

1. Titel van het project: Evaluation of novel influenza vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against influenza infection in macaques
2. Titel van de NTS: Onderzoek naar de beschermende werking van nieuwe griepvaccins.
3. Type aanvraag:
 - X nieuwe aanvraag projectvergunning
4. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: 10.2.g
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.g
 - mailadres contactpersoon: 10.2.g
5. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 03-03-2021 (11-03-2021: Verzoek om advies van CCD)
 - aanvraag compleet: 18-03-2021
 - in vergadering besproken: 11-03-2021
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van/tot 15-03-2021 tot 18-03-2021
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen nvt
 - aanpassing aanvraag 18-03-2021
 - advies aan CCD: 25-03-2021
6. 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 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.

7. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 15-03-2021
- De gestelde vragen betroffen de volgende onderwerpen:
 - Entree criteria voor de vaccins die onderzocht zullen worden
 - Onderbouwing en uitleg mucosale toediening
 - Toedieningswijzen vaccins
 - Tijdstip van plaatsten telemetrie apparaten
 - Keuze sedatie of anesthesie voor experimentele handelingen
 - Beschrijving humaan eindpunt criteria
 - Keuze tussen soorten makaken (criteria)
 - Tekstuele aanpassingen aan NTS
- Datum antwoord: 18-03-2021
- Verstreckte antwoorden: De gestelde vragen zijn naar tevredenheid beantwoord.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC). N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunning-plichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. De DEC is competent om hierover te adviseren: De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen kennis over immunologie en kennis over vaccins tegen influenzavirussen, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op het gebied van ontwerp van proeven, statistiek, de proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, van proefdieren en hun bescherming en ethiek.
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 leden is betrokken bij dit onderzoek. Dit lid heeft de vergadering verlaten tijdens de bespreking van het project en was niet betrokken bij de advisering aan de CCD.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

Dit project betreft preklinisch onderzoek naar de mogelijke bijwerkingen, immunogeniciteit en effectiviteit van nieuwe (vormen van) vaccins die ontwikkeld worden ter voorkoming van ziekte veroorzaakt door influenzavirussen in makaken. Het betreft vaccins die brede bescherming kunnen bieden tegen verschillende varianten van influenzavirussen en/of vaccins die gebruik maken van nieuwe vaccinatie strategieën. In de aanvraag is (terecht) een aantal voorwaarden gesteld waaraan kandidaat vaccins moeten voldoen alvorens tot verdere evaluatie in makaken kan worden overgegaan. Indien gebruik gemaakt moet worden van een nieuwe virusvariant voor de besmetting, zullen eerst experimenten moeten worden uitgevoerd om te bepalen wat de juiste besmettingsdosis en route is voor die variant en eventueel welke makaak-soort hiervoor geschikt is. Immunisaties met de kandidaat vaccins zullen eerst worden uitgevoerd en geëvalueerd voordat besmetting plaatsvindt. Alleen wanneer de immuunrespons voldoende is, zal besmetting plaatsvinden om te onderzoeken of het vaccin voldoende kan beschermen tegen infectie en/of de ziekte.

De aanvraag heeft een duidelijk omschreven en concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is het ook duidelijk met welk ongerief individuele dieren zullen worden geconfronteerd. De DEC is ervan overtuigd dat er gedurende de looptijd van het project op zorgvuldige wijze besluiten zullen worden genomen over de voortgang van het onderzoek en dat er niet onnodig dieren zullen worden gebruikt. De DEC vindt dat het project toetsbaar is en voldoende samenhang heeft om aangemerkt te worden als een project.
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 doelcategorieën, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek' sluiten aan bij het projectvoorstel. In dit projectvoorstel zal worden onderzocht of nieuwe types kandidaat influenzavaccins bescherming bieden tegen (de gevolgen van) een influenzavirus infectie. Wanneer een vaccin voldoende bescherming biedt, kan dit vervolgens in een klinische studie getest worden. Het uiteindelijke doel is een universeel influenzavaccin te ontwikkelen dat slechts één keer in de circa vijf jaar gegeven hoeft te worden aan risicogroepen (ouderen, mensen met onderliggend lijden) en dat bescherming biedt tegen meerdere varianten van het virus.

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.

Influenza veroorzaakt jaarlijks een griepgolf die vooral voor ouderen en kwetsbare mensen met onderliggend lijden ernstige ziekte kan veroorzaken en daarmee behalve deze mensen ook de zorg extra belast. Daarom wordt deze groep mensen jaarlijks gevaccineerd. Het influenzavirus muteert echter veelvuldig en sommige varianten omzeilen ongewenst de afweer, die door eerdere infecties of vaccinatie met een vaccin tegen andere varianten dan de op dat moment circulerende variant(en) is ontstaan. Een mogelijke oplossing hiervoor is de ontwikkeling van nieuwe soorten vaccins die kunnen beschermen tegen vele varianten, inclusief toekomstige varianten van het virus. Op dit moment zijn zulke universele vaccins nog niet beschikbaar. Wel worden dit soort vaccins ontwikkeld en deze moeten voordat ze in de mens getest kunnen worden in relevante proefdiermodellen op veiligheid en effectiviteit getoetst worden. Het directe doel van dit project is de evaluatie van nieuwe (vormen van) influenzavaccins op bijwerkingen, immunogeniciteit en beschermende werking in resus of Java apen. Het uiteindelijke doel is een werkzaam vaccin op de markt te brengen dat kan worden toegepast in de relevante doelgroepen. 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 deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de zorginstellingen, maatschappij en met name kwetsbare mensen met onderliggende ziekte en ouderen, de aanvragende onderzoeksinstelling, de bedrijven die influenzavaccins ontwikkelen en de wetenschap.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. Er is sprake van instrumenteel gebruik; de dieren zullen door de huisvesting in een onderzoeksfaciliteit beperkt worden in hun natuurlijke gedrag. De dieren zullen stress ondervinden door biotechnische handelingen en mogelijk enige mate van pijn na het plaatsen van een datalogger. Daarnaast kunnen dieren ziekteverschijnselen ontwikkelen ten gevolge van de virusinfectie, met name koorts, hoesten, niezen, ademhalingsproblemen, benauwdheid en verlies aan eetlust.

Voor de potentiële patiënten, de zorginstellingen en de maatschappij is dit onderzoek van groot belang, omdat een vaccin dat niet elk jaar moet worden aangepast aan de circulerende virusstam en niet jaarlijks hoeft te worden gegeven er minder druk op de zorginstellingen zal ontstaan. Met een 'universeel griepvaccin' wordt de kans dat het vaccin niet beschermt tegen de nieuwe virusvariant die op dat moment circuleert sterk verkleind. Dit zal er voor zorgen dat er betere bescherming is tegen de gevolgen van een infectie met influenzavirus wat voor zowel individuele patiënten als voor de maatschappij van groot belang is. Voor de bedrijven die vaccins ontwikkelen geldt dat het op de markt brengen van een werkzaam vaccin van economisch belang is.

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie over de werkzaamheid van nieuwe types van vaccins die door hun ontwerp alleen goed in een niet-humane primaten diersoort geëvalueerd kunnen worden. Het is evident dat dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

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. De risico's worden beheerst door goede biologische inperking.

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.

De kennis en kunde binnen de instelling en de directe betrokkenen bij de dierproeven met primaten zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de jarenlange ervaring van de instelling met het testen van vaccins in makaken.

De DEC concludeert dat de aanvragers voor de uitvoering van de voorgestelde experimenten beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van de voorgestelde dierproeven.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet sluit hier logisch op aan. Eerst zullen de kandidaat vaccins getest worden op bijwerkingen en immunogeniciteit. Alleen als een vaccin geen onverwachte negatieve bijwerkingen heeft en voldoende immunogeen blijkt te zijn, zullen gevaccineerde dieren besmet worden met influenzavirus. De commissie is ervan overtuigd dat met de voorgestelde aanpak de doelen gehaald kunnen worden.

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 de noodzaak om niet-humane primaten te gebruiken voor de evaluatie voor influenzavaccins. Het gaat hierbij om nieuwe vaccins waarvan niet eerder is aangetoond dat deze werkzaam kunnen zijn in primaten. Ook zal dit vaccins voor humane toepassing betreffen die alleen in apen getest kunnen worden omdat componenten van de vaccins zeer soort-

specifiek zijn en niet kunnen worden geëvalueerd in andere proefdiersoorten. De DEC is het eens met het gebruik van apen voor dit onderzoek om deze redenen.

Hergebruik zal plaatsvinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven. De DEC is het eens met hergebruik van de dieren om deze redenen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De huisvesting en verzorging voldoen ten volle aan de vereisten in bijlage III van de richtlijn.

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 voor de dieren is correct als matig ingeschat. Het ongerief zal vooral veroorzaakt worden door het frequent bloed afnemen bij de dieren, het plaatsen van een datalogger, het uitvoeren van CT scans en het besmetten met influenzavirus met de daarop volgende klinische symptomen. De DEC is het eens met deze inschatting.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.

De integriteit van de dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik en experimentele procedures en de effecten daarvan. De gevolgen daarvan op de sociale context, lichamelijke integriteit en zelfredzaamheid van het dier blijven beperkt tot de duur van het experiment. Een deel van de dieren zal worden gedood voor nader onderzoek (wetenschappelijke uitkomst), dit impliceert niet zozeer aantasting van het welzijn maar wel van de integriteit.

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.

Het bereiken van een humaan eindpunt is goed gedefinieerd en toegespitst op de aard van het onderzoek. Dieren zullen niet onnodig lijden omdat de dieren direct uit de proef genomen zullen worden en adequaat behandeld zullen worden mochten er complicaties optreden. Het instituut heeft veel ervaring op het gebied van het testen van vaccins voor luchtweg virussen en de commissie acht het waarschijnlijk dat bij geen van de dieren het humane eindpunt bereikt zal worden.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte

vervangingsalternatieven zijn.

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De immuunrespons op een vaccin in een zoogdier is te complex om die in vitro of in silico te modelleren. Het is essentieel dat een vaccin zal worden getest op effectiviteit en veiligheid in een hiervoor relevante diersoort (zie ook C9).

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.

Er zullen in de loop van het project maximaal 3 vaccin kandidaten worden getest op mogelijke bijwerkingen, immunogeniciteit en bescherming tegen infectie. Daarvoor is ingeschat dat er per vaccintest maximaal 30 dieren zullen worden ingezet. De precieze groepsgroottes zijn op dit moment nog niet bekend en worden ingeschat op maximaal 10 dieren per groep. Op basis van power analyses zullen de uiteindelijke groepsgroottes worden bepaald waarmee statistisch significante en relevante resultaten kunnen worden behaald. Deze marges en daarmee het maximaal aantal te gebruiken dieren is op basis van de resultaten uit het voorafgaande onderzoek ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de aangevraagde looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee wetenschappelijk betrouwbare en verantwoorde resultaten kunnen worden verkregen (proefopzet, statistische power). Vanwege de op dit moment inherente onzekerheid over de variatie in de uitleesparameters is er door de indieners voor wat betreft het aantal dieren uitgegaan van een maximum scenario. Maximaal 3 nieuwe virusvarianten zullen worden gebruikt om vast te stellen welke virus dosis gebruikt moet worden voor de besmettingsproeven. Hiervoor zullen 4 dieren per dosisgroep, 2 dosisgroepen per virus en in totaal maximaal 24 dieren worden gebruikt. De commissie weegt mee dat hierbij ook het aantal vaccinkandidaten en aantal experimenten kader stellend zijn.

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 goed geadapteerde en sociaal gehuisveste dieren. Ook het gebruik van telemetrie om het verloop van de lichaamstemperatuur (en eventueel activiteit) te volgen is een noemenswaardige verfijning. Er zal sedatie worden toegepast tijdens de onderzoeksprocedures, en anesthesie waar nodig. Dieren worden gedurende de gehele studie gemonitord door ervaren diervverzorgers en een klinische scorelijst wordt bijgehouden. De dieren staan onder veterinaire begeleiding. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

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 per studie dieren van één geslacht gebruikt. De immunrespons van mannen en vrouwen is verschillend. Door dieren van hetzelfde geslacht te nemen zal de variatie in de proefuitkomsten zo klein mogelijk zijn en dit zal de variatie in de uitkomst parameters verkleinen. Daardoor zullen minder proefdieren nodig zijn dan wanneer er met groepen van gemengde geslachten wordt gewerkt. Er is geen sprake van overschotten.

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.

De dieren zullen niet worden gedood aan het einde van de studie tenzij er aanleiding is tot nader pathologisch onderzoek (wetenschappelijke uitkomst). De DEC is het eens met het eventuele hergebruik van de dieren mits er aan de kaders gesteld in de Wet op de Dierproeven wordt voldaan.

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.

De dieren zullen niet worden gedood aan het einde van de experimenten tenzij er bijwerkingen zijn die het noodzakelijk maken de dieren te doden (humaan eindpunt, wetenschappelijke analyse van oorzaak bijverschijnselen). De dieren kunnen eerder in onderzoek zijn gebruikt en kunnen na afloop voor hergebruik bestemd worden, dit alles met inachtneming van overwegingen rond geschiktheid en dierenwelzijn.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het belang van het ontwikkelen van nieuwe types vaccinkandidaten met een beoogde brede en langdurige werking tegen influenza het testen op bijwerkingen, immunogeniciteit, en op bescherming in apen, het ongerief dat de dieren daardoor wordt aangedaan en is bij de uitvoering van deze experimenten aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan? 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, andere onderzoek modellen of patiënten?
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.

Alle 114 dieren (resus of Java apen) zullen hoogstens matig ongerief ondergaan. Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Het betreft experimenten waarbij de dieren geïmmuniseerd worden met een experimenteel influenzavaccin en/of zullen worden besmet met influenzavirus. De welzijnsaantasting kan resulteren in ongerief na het plaatsen van een datalogger, het afnemen van bloed of slijmvlies monsters, en de klinische verschijnselen van de influenza infectie. Alle handelingen zullen onder sedatie of volledige narcose gebeuren. Het ongerief is dan veelal het bijkomen uit de verdoving/narcose. Ongerief en lijden zal zo veel mogelijk worden beperkt. Daarmee resulteert dit in maximaal matig ongerief voor de dieren.

De waarde voor de patiënten, de zorginstellingen en de samenleving is het op termijn beschikbaar komen

van een werkzaam universeel vaccin voor influenzavaccin dat een brede bescherming biedt tegen meerdere varianten van het virus en dat slechts een keer in de circa 5 jaar gegeven hoeft te worden. Op dit moment is er nog geen universeel influenza vaccin beschikbaar. Hierdoor is het noodzakelijk jaarlijks de samenstelling van het influenza vaccin aan te passen aan de op dat moment circulerende varianten. Echter deze zullen geen bescherming bieden tegen nieuwe varianten, waardoor er altijd een dreiging is op grote influenza uitbraken met veel patiënten die intensieve zorg nodig hebben. Het krijgen van beschikking over een universeel vaccin zal het aantal patiënten met ernstige verschijnselen ten gevolge van nieuwe varianten reduceren, zal de belasting van de zorg door de jaarlijkse vaccinaties verminderen en zullen nadelige economische en financiële effecten voor de maatschappij afnemen.

Voor de producent van het vaccin is het op de markt brengen van een vaccin van economisch belang. Echter het belang voor de maatschappij is aanzienlijk groter.

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 is overtuigd van het belang van de doelstelling: het testen van nieuwe types vaccinkandidaten voor influenza op bijwerkingen, immunogeniciteit, en op bescherming in niet-humane primaten. Het uiteindelijke doel is het op de markt brengen van een werkzaam universeel influenza vaccin. Deze doelstelling vertegenwoordigt een essentieel belang voor de maatschappij omdat de huidige vaccins alleen beschermen tegen het beperkte aantal varianten waartegen het vaccin is gericht, het virus veelvuldig muteert waardoor jaarlijks nieuwe vaccins nodig zijn. Met de ontwikkeling van een universeel influenzavaccin zal er voor langere tijd bescherming zijn tegen meerdere varianten van het virus, inclusief toekomstige varianten. De DEC is van mening dat het gebruik van niet-humane primaten voor dit onderzoek gerechtvaardigd is. Het gaat in dit onderzoek om nieuwe vaccinatie strategieën die pas klinisch kunnen worden getest als (ook) in niet-humane primaten is aangetoond dat de vaccins beschermen tegen een influenzavirus infectie.

De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het onderzoek en de uitvoering hiervan. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat voorkomen wordt dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten zullen ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is samenvattend van mening dat aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent de 3 V's en de kwaliteit van het onderzoek is voldaan en dat het hierboven genoemde belang voor de samenleving als geheel het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van welzijn en integriteit) rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

X Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD. Het betreft hier niet-humane primaten.

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten: geen

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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 bij de beoordeling van dit project geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.



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 the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

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

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal
- 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 2.1.

Influenza epidemics are estimated to result in infection of 2,5-10% of the world population every year, causing 2-5 million cases of severe illness and 250.000-500.000 deaths (1). Vaccination is considered the

most effective measure against the influenza disease and, as such, it is recommended by the European Council (2) and implemented in all EU/European Economic Area member states. The main problems of the current influenza vaccines are; a) they are not very effective in the elderly, b) they only protect against highly homologous strains, while circulating influenza virus strains constantly evolve as a result of antigenic drift, c) they do not protect against new pandemic strains that emerge as a result of recombination between different viral strains found in animal reservoirs, d) they do not protect against highly pathogenic avian influenza virus (3-5). These problems are amplified by the cumbersome current production methods, which involves growing the virus on eggs to prepare inactivated- or live attenuated- influenza vaccines. The 6 months required for vaccine manufacture means that the vaccines have to be based on predictions about which virus strains will circulate during the next influenza season. A mismatch between the vaccine and the actually circulating influenza strain(s) however, results in lower vaccine effectiveness as shown for the 2014-15 influenza season with regard to the H3N2 strain (6). New vaccine strategies that can provide broader protection and cover a range of seasonal influenza strains as well as pandemic and avian influenza virus strains are urgently needed (7). These so called "universal" influenza vaccines are directed at either a) inducing broadly neutralizing antibodies by targeting the relatively conserved stem region of the haemagglutinin (HA) subunit, which is responsible for virus entry into the target cell, b) induction of antibodies to the neuraminidase (NA) surface glycoprotein (8), c) inducing protective T-cell responses that are usually directed against more conserved proteins of the virus and therefore provide broad recognition (9, 10). Retrospective epidemiological studies as well as studies in experimentally infected volunteers indicate that in the absence of antibodies, cellular immune responses can have a protective effect (11-13). Their role in cross-protection was demonstrated in a H1N1 infection study in non-human primates (NHP) (14). More recently the appreciation of the importance of non-neutralizing anti-influenza antibodies in conferring broad protection against variant strains, especially in the case of avian influenza viruses, has prompted research into their mechanism of action (via antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC), antibody dependent phagocytosis (ADP) or complement activation (15-18) and vaccine strategies to induce these antibodies. New methods for faster vaccine production, the induction of T-cell responses and improvement of vaccine responses in the elderly have involved application of DNA, virus like particles (VLP), recombinant viral vectors and strategies to target vaccines to the appropriate antigen presenting cells (5, 19-23) and more recently the advent of mRNA-vaccines which facilitate fast responses as exemplified by COVID-19 vaccines from Pfizer and Moderna (24). Evaluation of the immunogenicity of these vaccines requires additional methods, besides the standard antibody ELISA, micro-neutralization and haemagglutination inhibition assays. Especially, proper assessment of adaptive cellular immune responses and function of the innate immune system in relation to non-neutralizing antibody effector function and induction of immune responses by these new vaccine modalities is needed (7).

Since influenza virus enters the body via the upper airways a vaccine should be able to induce not only systemic but also local immune responses at the portal of entry, i.e. in the nasal and oral mucosa and in the lungs to prevent spreading of the virus to that organ. Mucosal immunizations against influenza in humans are restricted to administration of live-attenuated (cold adapted) influenza virus. However, these vaccines cannot be given to persons with chronic heart or lung disease or persons that receive immunosuppressive drugs. Other mucosal vaccine modalities are still under development and are hampered by difficulty to achieve efficient vaccine uptake at mucosal surfaces and induction of tolerance (25).

Despite progress in the development of universal influenza vaccines, only few universal influenza vaccine candidates have progressed to clinical trials (26-28). In order to improve progress in the field of (universal) influenza vaccines, the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) has prepared a strategic plan outlining areas in our knowledge about influenza infection and immunity that require further investigation (7). Animal models have played an important role in preclinical evaluation of candidate influenza vaccines (29-31) and are still required during clinical development (7). While a number of species have been used, the most commonly used models to assess immunogenicity and efficacy against influenza virus infection are the mouse, ferret and NHP models. There are important differences between these species in immune function and susceptibility to influenza virus infection. Mice are not naturally susceptible to influenza and usually lethal infection models are used, that are based on extremely adapted human viruses. Ferrets are naturally susceptible to most human influenza viruses and recapitulate the natural course of infection. However, infection is often restricted to the upper airways and this model has the disadvantage that limited immunological tools are available, especially to study innate and cellular adaptive

immune responses, which are especially important in the evaluation of "universal" vaccine strategies (32). NHP play an important role in influenza virus research and have been used to study pathogenesis as well as efficacy of preventive and therapeutic intervention strategies (33). Of the different animal models used in influenza virus research, NHP have a unique close homology to humans in most components of their immune system (34-36). For instance, similar T and B-cell subsets have been described in NHP (37). Moreover, the immunoglobulin gene germline repertoire is highly conserved between macaques and humans, which is important when induction of broadly neutralizing antibodies by new "universal" influenza vaccine strategies is studied (38, 39). In addition, structure and function of Fc receptors, which are essential for the function of non-neutralizing antibodies, show many homologies between macaques and humans (40). Only very limited information is available on Fc receptors in ferrets and only reagents to detect the IgA receptor are available (32). Finally in NHP the innate immune system, including molecular pathways and antigen presenting cell subsets, are much more homologous to humans than what is seen in mice (35). NHP not only most closely reflect the human physiology, but also resemble humans in their clinical symptoms, limited pathology, pattern of viral replication, fever and cytokine and chemokine responses following influenza virus infection (41).

In conclusion, the strong immunological and physiological resemblances to humans make NHP a unique model in pre-clinical safety, immunogenicity and efficacy evaluation, particularly in relation to the new influenza virus vaccine delivery platforms being developed and for the evaluation of the important broadly neutralizing antibody, non-neutralizing antibody and cellular broadly protective immune responses. Evaluation in NHP is essential before the new "universal" influenza candidates can be evaluated in humans. Moreover, although challenge studies have been performed in humans (42), these are limited to the milder influenza strains and hampered by pre-existing immunity caused by previous exposures to influenza virus (43) limiting the value of the vaccine efficacy data that can be obtained.

Under project licence AVD10.2.g experiments were performed to refine the influenza virus infection model in macaques by evaluating aerosol delivery for infection with pandemic H1N1 (pH1N1) (44) influenza virus and highly pathogenic avian H5N1 influenza virus (45). Experimental infection in NHP is typically performed by either intra-tracheal, or a combination of intra-tracheal, intra-nasal and intra-ocular virus inoculation. However, influenza virus infection in humans is assumed to be mainly caused by exposure to aerosols or droplets that enter the airways either via respiration, inhalation or via contact with contaminated surfaces (43). Our studies showed that aerosol delivery resulted in infection of the upper as well as lower respiratory tract for both pH1N1 and H5N1 influenza virus. However, infection with pH1N1 after aerosolized exposure resulted in lower levels of immune activation and inflammation than infection via combined intra-bronchial, intra-nasal and oral delivery. For H5N1 infection via aerosol exposure led to less severe disease than combined-route exposure. Hence, the route of exposure has clear consequence for disease pathogenesis. This allows for a fine tuning of the applied infection model in relation to the research question. When vaccine mediated protection against infection is studied then aerosol exposure would be the best option as it mimics best the situation in humans and allows adequate detection of reduction in virus replication. However, if protection against infection is difficult to achieve then the second objective should be protection against disease and in this case a combined-route exposure model should preferably be used. In conclusion aerosol delivery is now a well established infection model. However, it will still be needed to set up infection models for new influenza viruses that have not been used in NHP before.

The current project licence AVD10.2.g runs until 10.2.g 2022. However, the institute has recently been granted a project in which a novel mucosal influenza vaccine strategy will be evaluated, consisting of a systemic immunization with DNA followed by an oropharyngeal spray immunization with an adenovirus expressing the vaccine antigens. The hypothesis is that with this method strong local immune responses will be induced in the lungs. This prime/boost strategy involves in total a 83 week study period, which falls beyond the end date of the current project licence.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

The goal of this project is to evaluate novel influenza virus vaccine candidates for occurrence of adverse effects, immunogenicity and capacity to protect against influenza virus infection in macaques. Both the capacity of new vaccine candidates to elicit a broad immune response, that not only protects against a homologous virus that is similar to the vaccine but also against heterologous viruses, as well as the immunogenicity of new influenza vaccine delivery platforms will be evaluated under this project application. The ultimate goal is to develop an influenza vaccine that can induce an immune response that is sufficiently broad to provide protection against seasonal influenza virus variants over a 5 year period (to obviate the need to vaccinate every year), is effective in elderly and can provide a degree of heterogeneous protection that would lead to reduced morbidity and mortality caused by pandemic as well as highly pathogenic avian influenza viruses.

The main goal can be divided in 2 sub-goals:

1. Vaccine evaluation. Immunogenicity and efficacy to protect against infection will be evaluated using an appropriate influenza virus challenge strain in relation to the type of vaccine being used.
2. Set-up infection model for influenza viruses that have not yet been used in NHP at our institute and that are needed for vaccine evaluation.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

At our institute we have been performing vaccine evaluation studies in NHP for over 20 years. Most vaccine candidates were directed against human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and tuberculosis. Since 2012 we have been working on influenza virus infection in macaques and the evaluation of vaccines against influenza (44-50). We have the appropriate facilities and experience to work with pathogenic viruses, including influenza virus, at DM-3 and ML-3 biosafety conditions. In addition, we have the appropriate immunological assays for assessment of cellular, humoral and innate immune responses against influenza. Our long-standing experience with pathogenic viruses, including influenza, and with vaccine evaluation guarantees that the animal studies describe in this proposal will be adequately performed.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

Annual influenza virus epidemics cause considerable morbidity and mortality world-wide and especially affect more vulnerable groups like young children, the elderly and people with pulmonary diseases. In addition, there is the continuous threat of the emergence of new viral recombinants that can cause a pandemic. Previous pandemics, especially the 1918 pandemic, have caused millions of deaths. Finally, avian influenza viruses are widely spread and can occasionally infect humans. Mutations that lead to a strong increase in transmission have been described (51), indicating that also these viruses pose a continuous threat to the human population. Current influenza vaccine strategies and vaccine production methods are not adequate to deal with such emergencies. Even for protection against the current seasonal influenza viruses, annual vaccination of risk groups is necessary. Hence a vaccine that could offer protection against a broader range of viruses, including yet unknown recombinants and avian influenza would be of great benefit to the community. In addition, annual vaccination would no longer be necessary since a broadly protective vaccine would be effective over a period of at least five years against newly emerging variants. This has led the EU and the USA to invest in the development of so called "universal" influenza vaccines that would fulfil these criteria. Both the application of new delivery methods, for instance in the form of DNA, mRNA or viral vectors, as well as new vaccine modalities, such as mucosal delivery, require evaluation in appropriate animal models so that the level as well as the mechanism of protection can be adequately established, before these new vaccines can be tested in clinical studies.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

The stakeholders for an influenza vaccine are the aforementioned target groups for whom protection from influenza infection and disease would increase their health and well-being. The vaccination of risk-groups and the resulting decrease in influenza burden would also be of great societal benefit. The animals involved in the experiments will not benefit and will experience moderate discomfort as a result of the experiments.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

In order to evaluate that; a new influenza virus vaccine candidate is immunogenic, has the capacity to protect against infection and that no adverse effects occur, a vaccine evaluation experiment will be performed according to well established procedures, as described in Appendix 1. Typically, one or a number of immunizations are given over a certain period of time. After immunization the induction of T-cell and antibody immune responses is measured. The strength of these responses as well their breadth, i.e. the capacity to recognize not only homologous viruses that are similar to the vaccine but also heterologous viruses, is determined. Subsequently, the capacity of the vaccine to protect against infection is tested by experimental infection of the animals with influenza virus. The choice of the virus strain to be used for experimental infection will depend on the outcome of the evaluation of the immune responses and the stage of development of the vaccine. An entirely new vaccine concept may require that in first instance protection against infection by a homologous virus strain is tested. However, for most vaccine candidates protection against infection with a heterologous virus will be tested. Experimental infection will only be performed when the immunization has induced virus inhibiting antibody and cellular immune responses against the virus used for experimental infection so that protection against infection is possible. Whether protection is actually achieved depends on local interaction between cells of the immune system and local anti-viral antibodies with the virus and virus infected cells in the respiratory tract. This cannot be adequately modelled in an *in vitro* system and requires experimental infection of an animal. Also mucosal delivery methods and combinations of systemic as well as mucosal delivery can only be evaluated in a complex multi-organ environment. Ideally, the vaccine should provide a robust level of protection and be able to reduce disease and virus multiplication in animals that receive a standard virus dose via aerosol delivery. If protection against infection is unlikely and protection against disease or early immune inflammation needs to be established then combined exposure to the upper respiratory tract and lungs needs to be applied. A virus dose must be chosen that is not unrealistically high (above 10^7 infectious particles), but high enough to lead to infection of all control animals.

In case proper evaluation of the capacity of a vaccine to protect against infection requires that a virus has to be used that has not been tested before in macaques at our institute then this virus will first be tested in a small number of animals. This to determine if all animals become infected and what the amount of virus multiplication is (Appendix 2). Either aerosol, intra-bronchial, oral, intranasal and intraocular inoculation is used, matching the method that will be used for the vaccine evaluation (Appendix 1).

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Vaccine candidates that fulfil the criteria for evaluation in NHP may be directly tested in a vaccine evaluation study (Appendix 1), if the influenza virus that will be used for establishing capacity of the vaccine to protect against infection has already been used in NHP at our institute. If this is not the case, the virus has to be tested first in an influenza virus infection study (Appendix 2). Also when efficacy against low dose aerosol infection has to be tested, a preceding influenza virus infection study (Appendix 2) is necessary.

Vaccine evaluation in macaques.

For this type of experiment animals will be immunized either once or they will receive a number of immunizations over a certain period of time. During the study animals will be monitored for adverse effects of the vaccine, including monitoring of general behaviour and health. Blood and occasionally nasal washes and lung lavages will be taken to measure induction of systemic as well as local immune responses. When adequate immune responses are induced that indicate that protection against infection might be achieved, the efficacy against infection will be tested by experimental infection with influenza virus. A group of non-vaccinated animals will be included as infection controls.

Vaccines that will be tested in NHP have to be in the final stages of 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 an animal species that has an immune system closely related to humans. Additional criteria for vaccine evaluation are: a) the vaccine strategy must be novel, for instance with regards to choice of antigen, formulation, route of application, that have not been tested before in similar NHP studies, b) demonstration that the vaccine or vaccine components are non-toxic, c) when specific host molecules are targeted then cross recognition of macaque homologues must have been demonstrated, d) the vaccine cannot be adequately tested in other than NHP animal models, for instance due to the mechanism of action or the type of immunological assessment needed, e) preferably immunogenicity of vaccine candidates should have been proven in other species, unless this is not possible because the specific vaccine modality used does not work in other species.

As stated above only novel vaccine candidates will be evaluated. The vaccine candidates should be designed with the aim to either strongly reduce vaccine production time or costs or to improve ease of use in resource poor settings or aim to achieve better and/or broader protection than the currently used vaccines (standard of care) against variant influenza strains and/or avian influenza virus (universal vaccine). Novelty will be evaluated by performing an extensive literature search and evaluation of currently planned or ongoing clinical trials (<https://clinicaltrials.gov/ct2/search>). The novel vaccine candidates are either developed within the framework of a research grant under public funding, that has received independent peer review, or by industry where it forms part of a product development strategy.

Influenza virus infection in macaques.

In order to establish infectivity and pathogenicity of a new virus that has not been tested previously in NHP at our institute, a small number of animals will be infected and monitored for clinical symptoms, fever, body weight and changes in blood parameters. Development of lesions in the lungs will be monitored by (PET)-CT analysis. Nasal and tracheal swabs will be taken to determine if the animals have become infected and determine the magnitude of virus multiplication. Proper application in vaccine evaluation requires that in these infection studies > 80% of the animals become infected and that the amount of virus produced in the trachea over the infection period is clearly measurable and that the variation between the animals is sufficiently low to allow measurement of reduction in virus load in vaccinated animals with less than 10 animals per group. In case these parameters are not achieved then the experiment will be repeated with a 10-100 times higher dose. In case any of the animals reaches the humane endpoint within the first four days after infection then a 10-100 times lower virus dose will be evaluated. The same criteria will be used to determine whether the aerosol infection model is sufficiently robust.

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

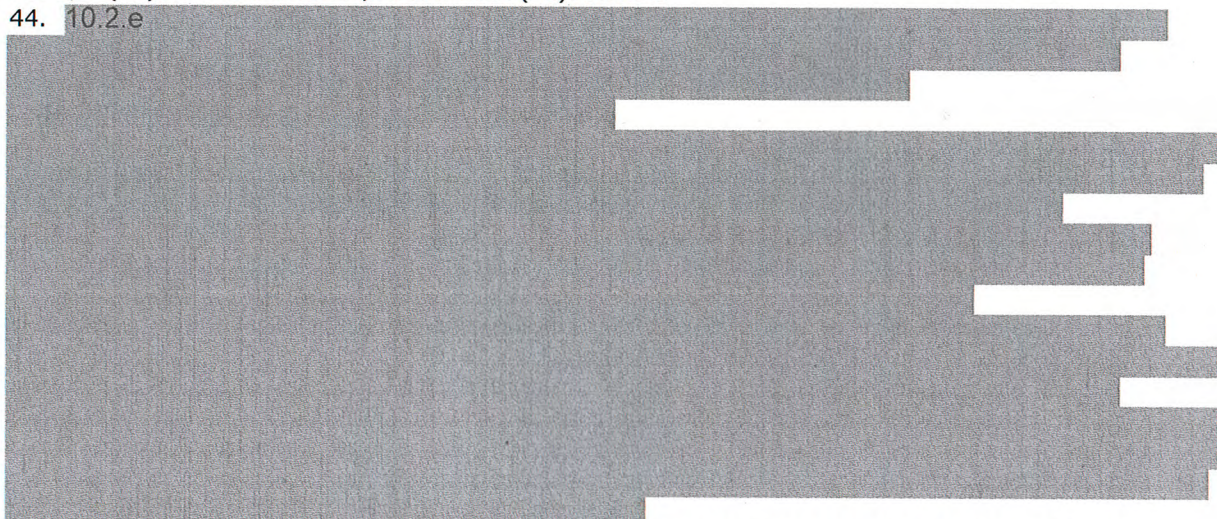

Serial number	Type of animal procedure
1	Influenza vaccine evaluation in macaques
2	Establishment of a new influenza infection model in macaques
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Referenties

1. WHO. Influenza (Seasonal) [Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))].

2. EC. Influenza [Available from: https://ec.europa.eu/health/vaccination/influenza_en.
3. de Vries RD, Altenburg AF, Rimmelzwaan GF. Universal influenza vaccines, science fiction or soon reality? *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(10):1299-301. 10.1586/14760584.2015.1060860
4. Osterhaus A, Fouchier R, Rimmelzwaan G. Towards universal influenza vaccines? *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2011;366(1579):2766-73. 10.1098/rstb.2011.0102
5. Krammer F, Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nature reviews Drug discovery*. 2015;14(3):167-82. 10.1038/nrd4529
6. Valenciano M, Kissling E, Reuss A, Rizzo C, Gherasim A, Horvath JK, et al. Vaccine effectiveness in preventing laboratory-confirmed influenza in primary care patients in a season of co-circulation of influenza A(H1N1)pdm09, B and drifted A(H3N2), I-MOVE Multicentre Case-Control Study, Europe 2014/15. *Euro Surveill*. 2016;21(7):pii=30139. 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.7.30139
7. Erbedding EJ, Post DJ, Stemmy EJ, Roberts PC, Augustine AD, Ferguson S, et al. A Universal Influenza Vaccine: The Strategic Plan for the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *J Infect Dis*. 2018;218(3):347-54. 10.1093/infdis/jiy103
8. Krammer F, Fouchier RAM, Eichelberger MC, Webby RJ, Shaw-Saliba K, Wan H, et al. NAction! How Can Neuraminidase-Based Immunity Contribute to Better Influenza Virus Vaccines? *MBio*. 2018;9(2). 10.1128/mBio.02332-17
9. Sridhar S. Heterosubtypic T-Cell Immunity to Influenza in Humans: Challenges for Universal T-Cell Influenza Vaccines. *Front Immunol*. 2016;7:195. 10.3389/fimmu.2016.00195
10. Wilkinson TM, Li CK, Chui CS, Huang AK, Perkins M, Liebner JC, et al. Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nature medicine*. 2012;18(2):274-80. 10.1038/nm.2612
11. McMichael AJ, Gotch FM, Noble GR, Beare PA. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *The New England journal of medicine*. 1983;309(1):13-7. 10.1056/NEJM198307073090103
12. Epstein SL. Prior H1N1 influenza infection and susceptibility of Cleveland Family Study participants during the H2N2 pandemic of 1957: an experiment of nature. *J Infect Dis*. 2006;193(1):49-53. 10.1086/498980
13. McElhaney JE, Xie D, Hager WD, Barry MB, Wang Y, Kleppinger A, et al. T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly. *J Immunol*. 2006;176(10):6333-9.
14. Weinfurter JT, Brunner K, Capuano SV, 3rd, Li C, Broman KW, Kawaoka Y, et al. Cross-reactive T cells are involved in rapid clearance of 2009 pandemic H1N1 influenza virus in nonhuman primates. *PLoS pathogens*. 2011;7(11):e1002381. 10.1371/journal.ppat.1002381
- 10.2.e
16. Jegaskanda S, Amarasena TH, Laurie KL, Tan HX, Butler J, Parsons MS, et al. Standard trivalent influenza virus protein vaccination does not prime antibody-dependent cellular cytotoxicity in macaques. *Journal of virology*. 2013;87(24):13706-18. 10.1128/JVI.01666-13
17. Jegaskanda S, Reading PC, Kent SJ. Influenza-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity: toward a universal influenza vaccine. *J Immunol*. 2014;193(2):469-75. 10.4049/jimmunol.1400432
18. Henry Dunand CJ, Leon PE, Huang M, Choi A, Chromikova V, Ho IY, et al. Both Neutralizing and Non-Neutralizing Human H7N9 Influenza Vaccine-Induced Monoclonal Antibodies Confer Protection. *Cell Host Microbe*. 2016;19(6):800-13. 10.1016/j.chom.2016.05.014
19. Florek NW, Weinfurter JT, Jegaskanda S, Brewoo JN, Powell TD, Young GR, et al. Modified vaccinia virus Ankara encoding influenza virus hemagglutinin induces heterosubtypic immunity in macaques. *Journal of virology*. 2014;88(22):13418-28. 10.1128/JVI.01219-14
20. Deliyannis G, Boyle JS, Brady JL, Brown LE, Lew AM. A fusion DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(12):6676-80.
21. Fossum E, Grodeland G, Terhorst D, Tveita AA, Vikse E, Mjaaland S, et al. Vaccine molecules targeting Xcr1 on cross-presenting DCs induce protective CD8+ T-cell responses against influenza virus. *Eur J Immunol*. 2015;45(2):624-35. 10.1002/eji.201445080

22. Grodeland G, Mjaaland S, Roux KH, Fredriksen AB, Bogen B. DNA vaccine that targets hemagglutinin to MHC class II molecules rapidly induces antibody-mediated protection against influenza. *J Immunol.* 2013;191(6):3221-31. 10.4049/jimmunol.1300504
23. Laddy DJ, Yan J, Khan AS, Andersen H, Cohn A, Greenhouse J, et al. Electroporation of synthetic DNA antigens offers protection in nonhuman primates challenged with highly pathogenic avian influenza virus. *Journal of virology.* 2009;83(9):4624-30. 10.1128/JVI.02335-08
24. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nature reviews Drug discovery.* 2018;17(4):261-79. 10.1038/nrd.2017.243
25. Kozlowski PA, Aldovini A. Mucosal Vaccine Approaches for Prevention of HIV and SIV Transmission. *Curr Immunol Rev.* 2019;15(1):102-22. 10.2174/1573395514666180605092054
26. Nachbagauer R, Feser J, Naficy A, Bernstein DI, Guptill J, Walter EB, et al. A chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccine approach induces broad and long-lasting immunity in a randomized, placebo-controlled phase I trial. *Nature medicine.* 2020;10.1038/s41591-020-1118-7. 10.1038/s41591-020-1118-7
27. Atsmon J, Kate-Ilovitz E, Shaikovich D, Singer Y, Volokhov I, Haim KY, et al. Safety and immunogenicity of multimeric-001--a novel universal influenza vaccine. *J Clin Immunol.* 2012;32(3):595-603. 10.1007/s10875-011-9632-5
28. van Doorn E, Liu H, Ben-Yedidia T, Hassin S, Visontai I, Norley S, et al. Evaluating the immunogenicity and safety of a BiondVax-developed universal influenza vaccine (Multimeric-001) either as a standalone vaccine or as a primer to H5N1 influenza vaccine: Phase IIb study protocol. *Medicine.* 2017;96:e6339. 10.1097/MD.0000000000006339. 10.1097/MD.0000000000006339.
29. Bodewes R, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Animal models for the preclinical evaluation of candidate influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2010;9(1):59-72. 10.1586/erv.09.148
30. Bouvier NM, Lowen AC. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses.* 2010;2(8):1530-63. 10.3390/v20801530
31. 10.2.e
32. Albrecht RA, Liu WC, Sant AJ, Tompkins SM, Pekosz A, Meliopoulos V, et al. Moving Forward: Recent Developments for the Ferret Biomedical Research Model. *mBio.* 2018;9(4). 10.1128/mBio.01113-18
33. Davis AS, Taubenberger JK, Bray M. The use of nonhuman primates in research on seasonal, pandemic and avian influenza, 1893-2014. *Antiviral research.* 2015;117:75-98. 10.1016/j.antiviral.2015.02.011
34. Sanghavi SK, Shankarappa R, Reinhart TA. Genetic analysis of Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) domain sequences from rhesus macaque Toll-like receptors (TLRs) 1-10 reveals high homology to human TLR/TIR sequences. *Immunogenetics.* 2004;56(9):667-74. 10.1007/s00251-004-0734-6
35. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 2004;172(5):2731-8.
36. Jacobsen FW, Padaki R, Morris AE, Aldrich TL, Armitage RJ, Allen MJ, et al. Molecular and functional characterization of cynomolgus monkey IgG subclasses. *J Immunol.* 2011;186(1):341-9. 10.4049/jimmunol.1001685
37. Demberg T, Robert-Guroff M. B-Cells and the Use of Non-Human Primates for Evaluation of HIV Vaccine Candidates. *Curr HIV Res.* 2015;13(6):462-78.
38. Link JM, Hellinger MA, Schroeder HW, Jr. The Rhesus monkey immunoglobulin IGHD and IGHJ germline repertoire. *Immunogenetics.* 2002;54(4):240-50. 10.1007/s00251-002-0468-2
39. Sundling C, Li Y, Huynh N, Poulsen C, Wilson R, O'Dell S, et al. High-resolution definition of vaccine-elicited B cell responses against the HIV primary receptor binding site. *Sci Transl Med.* 2012;4(142):142ra96. 10.1126/scitranslmed.3003752
40. Hogarth PM, Anania JC, Wines BD. The FcγR of humans and non-human primates and their interaction with IgG: implications for induction of inflammation, resistance to infection and the use of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;382:321-52. 10.1007/978-3-319-07911-0_15

41. O'Donnell CD, Subbarao K. The contribution of animal models to the understanding of the host range and virulence of influenza A viruses. *Microbes Infect.* 2011;13(5):502-15. 10.1016/j.micinf.2011.01.014
42. Carrat F, Vergu E, Ferguson NM, Lemaître M, Cauchemez S, Leach S, et al. Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies. *American journal of epidemiology.* 2008;167(7):775-85. 10.1093/aje/kwm375
43. Killingley B, Enstone J, Booy R, Hayward A, Oxford J, Ferguson N, et al. Potential role of human challenge studies for investigation of influenza transmission. *The Lancet Infectious diseases.* 2011;11(11):879-86. 10.1016/S1473-3099(11)70142-6
44. 10.2.e
- 
49. Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, Wagner MV, Zhu X, Hoffman RM, et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science.* 2015;349(6254):1301-6. 10.1126/science.aac7263
50. 10.2.e
- 
51. Linster M, van Boheemen S, de Graaf M, Schrauwen EJ, Lexmond P, Manz B, et al. Identification, characterization, and natural selection of mutations driving airborne transmission of A/H5N1 virus. *Cell.* 2014;157(2):329-39. 10.1016/j.cell.2014.02.040