

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

Serial number	Type of animal procedure
<u>2</u>	Establishment of a new influenza infection model in macaques

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

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 (1-3). 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. Indicated is which procedure is performed under sedation and which procedure under deep anesthesia.

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

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. Experiments will preferentially be performed in cynomolgus macaques. However, if after virus inoculation the levels of virus production are too low (below the detection limit) or too variable (>10 animals needed/group) then the virus will subsequently be tested in rhesus macaques.

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, 2, 4-7). 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. <u>Previous studies have shown that cynomolgus macaques are more susceptible than rhesus macaques for infection with pH1N1 influenza virus. Cynomolgus macaques show higher levels of virus replication and more fever than rhesus macaques (2). However, for other influenza viruses it is not known which of the two species is the most susceptible. Therefore, experiments will preferentially be performed in cynomolgus macaques. However, if after virus inoculation the levels of virus production are too low (below the detection limit) or too variable (>10 animals needed/group) then the virus will subsequently be tested in rhesus macaques.</u>
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. <u>There are immunological differences between males and females (8, 9). However, for influenza vaccine induced responses these differences are only modest (10) and not observed in all reports (11) and are unlikely to affect study outcome in pre-clinical studies with relatively low number of animals. Therefore, both male and female animals can be used.</u>
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?

1. Discomfort because of insertion or removal of the temperature recording device
2. Discomfort due to lung lavages
3. Discomfort due to virus installation
4. Discomfort due to PET-CTs
5. Stress because of sedation and recovery
6. Reduced food intake during the first days after infection
7. Disease symptoms due to the infection

Explain why these effects may emerge.

1. The surgery needed for insertion and removal of the temperature recording device will cause pain and some local inflammation.
2. For the lung lavages a bronchoscope is used. Insertion will cause irritation.
3. 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.
4. 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
5. 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.
6. Especially during daily sedation during the first 2 days after infection food intake might be reduced.
7. 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.

1. Surgery will be done under anaesthesia and after surgery analgesics will be applied.
2. For the lung lavages animals are first deeply sedated and then receive a local muscle relaxant.
3. The same procedure as described under 3 will be followed
4. 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.
5. Recovery of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.
6. Animals will receive supportive feeding with dense "brokkenballen".
7. 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 (12). 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 associated with score 35 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	<p>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 (13, 14). 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.</p>
Reduction	<p>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.</p>

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 (2). With this method we have observed a significant reduction in fever by influenza vaccine candidates (6). 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. (12). 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.

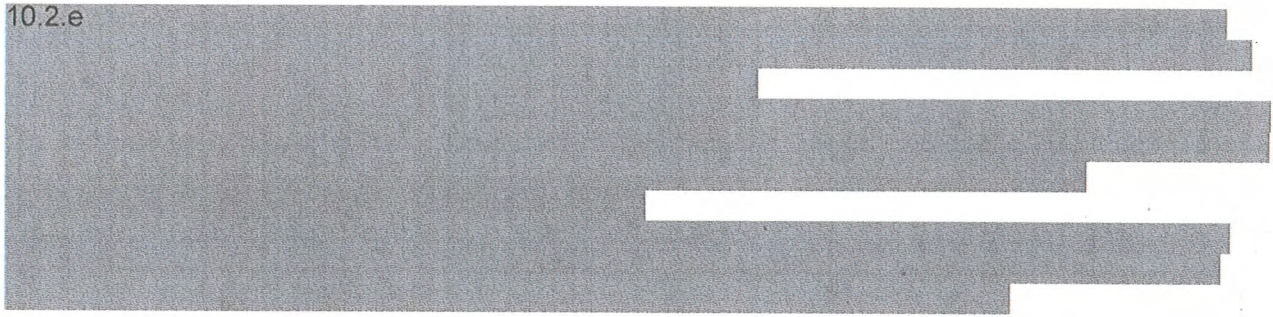
Euthanasia is done by injection of an anaesthetic dose of ketamine followed by an overdose of barbiturate intravenously

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



10.2.e

6. 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

10.2.e

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. 10.1093/trstmh/tru167
9. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nature reviews Immunology*. 2016;16:626-38. 10.1038/nri.2016.90 10.1038/nri.2016.90. Epub 2016 Aug 22.
10. Potluri T, Fink AL, Sylvia KE, Dhakal S, Vermillion MS, Vom Steeg L, et al. Age-associated changes in the impact of sex steroids on influenza vaccine responses in males and females. *NPJ Vaccines*. 2019;4:29. 10.1038/s41541-019-0124-6
11. Tadount F, Doyon-Plourde P, Rafferty E, MacDonald S, Sadarangani M, Quach C. Is there a difference in the immune response, efficacy, effectiveness and safety of seasonal influenza vaccine in males and females? - A systematic review. *Vaccine*. 2020;38(3):444-59. 10.1016/j.vaccine.2019.10.091
12. 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.
13. 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
14. Bouvier NM, Lowen AC. Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses*. 2010;2(8):1530-63. 10.3390/v20801530

Antwoorden op vragen van de CCD betreffende aanvraag projectvergunning dierproeven
AVD 10.2.g 202114680

Beste leden van de CCD,

Hieronder vindt u de antwoorden op de door u op 21-04-2021 gestelde vragen. Tevens zijn de onderdelen van de aanvraag die zijn gewijzigd bijgevoegd. De wijzigingen zijn in de aanvraag aangegeven met paarse tekst.

Vriendelijke groeten,

10.2.e

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?

In de NTS stond aan het einde van **objectives of the project**: "Het doel van dit project is om deze nieuwe griepvaccins in apen te testen om vast te stellen of ze geen onverwachte bijwerkingen geven, een goede afweerreactie tegen griep opwekken en of het vaccin bescherming biedt tegen griepinfectie." Wij hebben hieraan toegevoegd dat het om een direct doel gaat. Het kan zijn dat dit niet geheel duidelijk was aangezien de tekst niet geheel binnen het veld past en pas na dubbel klikken in zijn geheel tevoorschijn komt.

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?

Alhoewel er in de literatuur diverse aanwijzingen zijn voor verschillen tussen mannen en vrouwen in immuun functie en respons na vaccinatie, zijn deze verschillen in geval van vaccinatie tegen influenza, vrij gering (Potluri et al. 2019 NPJ Vaccine, vol. 4: 29) en is de literatuur hierover niet altijd eenduidig (Tadount et al. 2019 Vaccine, vol. 38: 444). Bij relatief lage aantallen proefdieren zullen deze verschillen waarschijnlijk niet statistisch significant zijn. Er zullen waarschijnlijk zeer veel dieren nodig zijn om statistisch significante verschillen te vinden tussen experimenten met alleen mannetjes versus alleen vrouwtjes. Vanwege deze overwegingen is in de bijlages 1 en 2 nu geen voorkeur meer opgenomen voor uitvoeren van de studies met alleen vrouwtjes of mannetjes (zie bijlage 1 en 2 B).

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

Het volgnummer is nu aangepast.



Advies aan CCD

Datum 21 april 2021
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114680

Instelling: 10.2.g
Onderzoeker: 10.2.e
Project: Evaluation of novel influenza vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against influenza infection in macaques
Aanvraagnummer: AVD202114680
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

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

Proces	<p>Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC.</p> <p>Aan de aanvrager is gevraagd over de NTS: Er staat niet in de NTS beschreven wat het directe doel van uw onderzoek inhoudt. Wilt u dit in de NTS opnemen?</p> <p>Over de bijlage dierproeven: 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?</p> <p>U heeft in bijlage 3.4.4.2. als volgnummer 1 in plaats van volgnummer 2 ingevuld. Kunt u dit aanpassen?</p>
---------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1. Influenza vaccine evaluation in macaques				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		45	Niet menselijke primaten
	Java-apen (Macaca fascicularis)		45	Niet menselijke primaten
3.4.3.2. Establishment of a new influenza infection model in macaques				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		12	Niet menselijke primaten
	Java-apen (Macaca fascicularis)		12	Niet menselijke primaten

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1. Influenza vaccine evaluation in macaques

Rhesusapen (Macaca mulatta) Citaat: 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 minimize 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.

Java-apen (Macaca fascicularis)

Zie Rhesusaap.

3.4.3.2. Establishment of a new influenza infection model in macaques

Rhesusapen (Macaca mulatta) Zie bijlage 3.4.3.1.

Java-apen (Macaca fascicularis)

Zie bijlage 3.4.3.1.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
Maatschappij	11.1 Bij deze projectaanvraag zal gebruik worden gemaakt van niet humane primaten.

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Het DEC advies is volledig en kan als grondslag dienen voor het besluit.</p> <p>Citaat C9: Gebruik van niet menselijke primaten en hergebruik, 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 soortspecifiek 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.</p> <p>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.</p> <p>Citaat C18: 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.</p> <p>Citaat C19: 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.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: Citaat:</p> <ol style="list-style-type: none">1. 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. 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. 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.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Vragen over de volgende onderwerpen zijn gesteld aan de aanvrager:

- 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

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
	Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. Citaat: 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.
Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld.	
Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	Citaat: 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.
-------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: 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.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1
<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat C7 uit het DEC advies: 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.</p> <p>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.</p> <p>Het Secretariaat 11.1</p>

3V's

Vervanging

3.4.3.1. Influenza vaccine evaluation in macaques: Citaat: The immune system is very complex and the in vivo interactions between virus and/or vaccine and host are not completely understood. At present there is no in vitro model available that can mimic the human immune system sufficiently to study the potential of a vaccine to induce protective immune responses. 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 model.

Several animal species have been used as a model for human influenza virus infection (10). However, 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. NHP have an immune system that most closely resembles that of humans. Also the availability of many cross reactive reagents makes it possible to study in detail the contribution of the innate immune system and to analyse vaccine induced immune responses and evaluate their role in control of infection. In addition, vaccine strategies that aim to trigger immune responses through targeting of specific cell surface molecules or innate immune receptors have either limited cross reactivity to other animal species or trigger different cell types or different responses because of differences in receptor expression pattern or cell signalling pathways. These aspects are essential for the evaluation of so called "universal" influenza vaccines. For this type of vaccines new vaccination strategies as well as vaccine modalities are used that aim for the induction of cross protective cellular immune responses or induction of broadly cross neutralizing antibody responses or nonneutralizing antibody responses that become effective through interaction with innate immune cells. Here, the close homology between the immune system in NHP and humans is essential for proper induction and adequate analysis of these responses, allowing a better extrapolation to the human situation. 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.

	<p>3.4.3.2. Establishment of a new influenza infection model in macaques: Citaat: 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 (11, 12). 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.</p>
Verminderen	
	<p>3.4.3.1. Influenza vaccine evaluation in macaques: Citaat: The number of animals needed per experiment will be based on statistical power calculation for achieving statistically significant induction of immune responses and a significant reduction in virus load in the respiratory tract between the vaccine groups and the challenge control group. Only the minimum number of animals needed will be used. Since historical data are available on infection in non-vaccinated animals (appendix 2), usually less animals can be used in the challenge control group than in the vaccine groups. Furthermore, we aim to evaluate multiple vaccine candidates in a single experiment, so that a single challenge control group can be used. This has to be weighed against the fact that in order to obtain significant differences in immune response between the vaccine groups, more animals per vaccine group may occasionally be required.</p>
	<p>3.4.3.2. Establishment of a new influenza infection model in macaques: Citaat: 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.</p>

Verfijnen	
	<p>3.4.3.1. Influenza vaccine evaluation in macaques: Citaat: 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 (2). 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. 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 and competent 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. Possible local reactions on the injection site of the vaccine will be recorded at multiple time points using a scoring system that includes redness, swelling and induration. In case substantial induration is seen, then the wound will be treated and analgesics will be applied. During the infection phase, 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 clinical disease. All handlings will be performed under sedation. On every time point where 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>
	<p>3.4.3.2. Establishment of a new influenza infection model in macaques: Zie bijlage 3.4.3.1.</p>

Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	-----------------------------------------

3.4.3.1. Influenza vaccine evaluation in macaques: Citaat: 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 preexisting 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.

3.4.3.2. Establishment of a new influenza infection model in macaques: Zie bijlage 3.4.3.1.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1. Influenza vaccine evaluation in macaques	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2. Establishment of a new influenza infection model in macaques	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1. Influenza vaccine evaluation in macaques	HEP: Citaat: 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.	Citaat: Animals are monitored twice daily and 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 associated with score 35 that lead to an immediate endpoint are: open mouth breathing or cyanosis, lethargy as defined by minimal response to human approach.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	
Java-apen (Macaca fascicularis)	Ongerief: 100,0% Matig	
3.4.3.2. Establishment of a new influenza infection model in macaques	HEP: Zie bijlage 3.4.3.1.	Zie bijlage 3.4.3.1.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	
Java-apen (Macaca fascicularis)	Ongerief: 100,0% Matig	

Opmerkingen over de dierproeven

Naam proef	Opmerkingen
3.4.3.1. Influenza vaccine evaluation in macaques	Er worden 90 dieren in totaal vergund in deze bijlage. Dit kunnen zowel Rhesus apen (Macaca mulatta) of Java-apen (Macaca fascicularis) zijn. Wanneer er in totaal meer dan 45 Rhesus apen worden gebruikt hoeft dit niet gemeld te worden. Ditzelfde geldt voor het gebruik van Java-apen. Het maximaal aantal te gebruiken dieren mag niet meer dan 90 zijn.
3.4.3.2. Establishment of a new influenza infection model in macaques	Er worden 24 dieren in totaal vergund in deze bijlage. Dit kunnen zowel Rhesus apen (Macaca mulatta) of Java-apen (Macaca fascicularis) zijn. Wanneer er in totaal meer dan 12 Rhesus apen worden gebruikt hoeft dit niet gemeld te worden. Ditzelfde geldt voor het gebruik van Java-apen. Het maximaal aantal te gebruiken dieren mag niet meer dan 24 zijn.

5 Samenvatting

11.1

Deze aanvraag is een vervolg op een eerder vergunde aanvraag (AVD 10.2.g waarvan de vergunning 10.2.g 2022 zal verlopen. Bij deze vergunde aanvraag wordt onderzoek gedaan naar het verfijnen van een influenza virus infectie model in makaken door het onderzoeken van aerosole infectie met H1N1 en H5N1 influenza virus.

In onderliggende projectaanvraag zal gebruik worden gemaakt van niet humane primaten. Dit onderzoek betreft 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 soortspecifiek zijn en niet kunnen worden geëvalueerd in andere proefdiersoorten. De DEC vindt de keuze van het gebruik van NHP voldoende onderbouwd 11.1

Het grootste deel van de dieren zal worden hergebruikt. Alleen wanneer er aanleiding is tot nader pathologisch onderzoek (wetenschappelijke uitkomst), zal een deel van de dieren worden gedood. De DEC vindt dit voldoende onderbouwd 11.1

Er zal gebruik worden gemaakt van 1 geslacht om zo de variatie in de proefuitkomst zo laag mogelijk te houden en hierdoor minder dieren te gebruiken. De DEC vindt dit voldoende onderbouwd. Gezien het translationele karakter van het onderzoek heeft het Secretariaat aan de aanvrager gevraagd te onderbouwen waarom er per studie niet beide geslachten worden ingezet.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

Het Secretariaat 11.1

Het Secretariaat 11.1

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Van: info@zbo-ccd.nl
Aan: Braunstahl, drs. F. (Ferry); 10.2.e
Cc: 10.2.e
Onderwerp: Ondertekening AVD 10.2.g 202114680
Datum: maandag 10 mei 2021 14:19:00

19

Aanvraag AVD 10.2.g 202114680 staat klaar ter ondertekening.
Het betreft een nieuwe aanvraag.

10.2.e

Van: Braunstahl, drs. F. (Ferry)
Aan: 10.2.e
Onderwerp: RE: Ondertekening AVD 10.2.g 202114680 akkoord
Datum: maandag 10 mei 2021 15:20:58

Heldere weergave bij de aantallen apen.
Klein dingetje NL: zowel...als... ipv zowel...of... staat 2x in de tabel. Maar voor iedereen helder,
dus ik heb m akkoord gegeven.
Groet! Ferry

Van: info@zbo-ccd.nl

Verzonden: maandag 10 mei 2021 15:20

Aan: Secretariaat OBDA

CC: 10.2.e

Onderwerp: Ondertekening AVD 10.2.g 202114680 akkoord

Beste 10.2.e

De beschikking van aanvraag AVD 10.2.g 202114680 is ondertekend.
Het betreft een nieuwe aanvraag.

Ferry Braunstahl

10.2.e

Van: 10.2.e
Verzonden: dinsdag 11 mei 2021 12:27
Aan: 10.2.e
CC: 10.2.e
Onderwerp: Beschikking en DEC advies AVD 10.2.g 202114680
Bijlagen: Logo

21



Geachte 10.2.e

In de bijlage treft u het besluit op uw digitaal ontvangen aanvraag voor een projectvergunning.

Gedurende de behandeling van uw aanvraag hebben wij hierover met u per e-mail gecorrespondeerd. Op uw verzoek hebben wij de verantwoordelijk onderzoeker uit uw organisatie in de CC gezet.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

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

.....
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
T: 0800-7890789
E: info@zbo-ccd.nl

For English, see below
Lijst met bestanden:
(No files were sent)

Je credentials:

Single-Click Login: [Klik hier om bestanden direct uit te wisselen.](#)

Of

Login: <https://webftp.dictu.nl>

Gebruiker: 10.2.g

Wachtwoord: 10.2.g

Bovenaande gebruiker is tijdelijk. Na 5/18/2021 12:00:00 AM wordt deze gebruiker en de bijbehorende inhoud verwijderd.

Tip: ZIP bestanden om het up-en downloaden te vergemakkelijken.

Dit bericht is gestuurd via DICTU NetFTP.

Geachte 10.2.e

In de bijlage treft u het besluit op uw digitaal ontvangen aanvraag voor een projectvergunning.

Gedurende de behandeling van uw aanvraag hebben wij hierover met u per e-mail gecorrespondeerd. Op uw verzoek hebben wij de verantwoordelijk onderzoeker uit uw organisatie in de CC gezet.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

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

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
T: 0800-7890789
E: info@zbo-ccd.nl

File list:
(No files were sent)

Your credentials:

Single-Click Login: [Click here to begin exchanging files.](#)

Or

Login: <https://webftp.dictu.nl>

Username: 10.2.g

Password: 10.2.g

This is a temporary user account only. The account and associated contents will be deleted after 5/18/2021 12:00:00 AM.

Tip: ZIP files for your convenience..

This message is send by DICTU NetFTP.



> 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
AVD10.2.g202114680
Bijlagen
3

Datum 10 mei 2021
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e,

Op 11 maart 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 AVD10.2.g 02114680. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 juni 2021 tot en met 31 mei 2026. Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

Procedure

Datum:

10 mei 2021

Aanvraagnummer:

AVD 10.2.g 202114680

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 10.2.g (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 25 maart 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 21 april 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het aanpassen van de Niet Technische Samenvatting en het onderbouwen van het gebruik van beide geslachten in 1 studie. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

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

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d van de wet. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2027 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht

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

Datum:
10 mei 2021
Aanvraagnummer:
AVD10.2.g.202114680

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).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2.g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: 10.2.g

Adres: 10.2.g

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer: 10.2.g

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2021 tot en met 31 mei 2026, voor het project "Evaluation of novel influenza vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against influenza infection in macaques" met aanvraagnummer AVD10.2.g 202114680, na advies van dierexperimentencommissie 10.2.g. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.e

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 11 maart 2021
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 25 maart 2021;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1. Influenza vaccine evaluation in macaques, zoals ontvangen op 23 april 2021;
 - 3.4.3.2. Establishment of a new influenza infection model in macaques, zoals ontvangen op 23 april 2021;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 23 april 2021;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 25 maart 2021
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 23 april 2021.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief	Overige opmerkingen
3.4.3.1. Influenza vaccine evaluation in macaques				Er worden 90 dieren in totaal vergund in deze bijlage. Dit kunnen zowel Rhesus apen (<i>Macaca mulatta</i>) of Java-apen (<i>Macaca fascicularis</i>) zijn. Wanneer er in totaal meer dan 45 Rhesus apen worden gebruikt hoeft dit niet gemeld te worden. Ditzelfde geldt voor het gebruik van Java-apen. Het maximaal aantal te gebruiken dieren mag niet meer dan 90 zijn.
	Rhesusapen (<i>Macaca mulatta</i>)	45	100,0% Matig	

Aanvraagnummer: AVD10.2.g 202114680

	Java-apen (Macaca fascicularis)	45	100,0% Matig	
3.4.3.2. Establishment of a new influenza infection model in macaques				Er worden 24 dieren in totaal vergund in deze bijlage. Dit kunnen zowel Rhesus apen (Macaca mulatta) of Java-apen (Macaca fascicularis) zijn. Wanneer er in totaal meer dan 12 Rhesus apen worden gebruikt hoeft dit niet gemeld te worden. Ditzelfde geldt voor het gebruik van Java-apen. Het maximaal aantal te gebruiken dieren mag niet meer dan 24 zijn.
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	12	100,0% Matig	
	Java-apen (Macaca fascicularis)	12	100,0% Matig	

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Aanvraagnummer: AVD 10.2.0 202114680

- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD10.2.g 202114680

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD10.2.g 02114680

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

Levensloofdossier

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

Niet-menselijke primaten

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die

Aanvraagnummer:

AVD10.2.g 202114680

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

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: dinsdag 18 mei 2021 11:32
Aan: 10.2.g
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 10.2.g 202114680

Geachte 10.2.g

Op 11-03-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het 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.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op het aanpassen van de Niet Technische Samenvatting en het onderbouwen van het gebruik van beide geslachten in 1 studie.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 11-5-2021.

Beoordeling achteraf is nodig omdat het een aanvraag met niet humane primaten betreft.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld.

Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, 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

