



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 50400 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	TNO Triskelion BV
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	51382997
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Utrechtseweg 48
		Postbus	844
		Postcode en plaats	3704 HE Zeist
		IBAN	NL10INGB0654470189
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	TNO Triskelion BV
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	Dr. E.D. Quakkelaar ☐ Dhr. ☒ Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	088 [REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]@tno.triskelion.nl
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] ☒ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	088 [REDACTED]
		E-mailadres	r[REDACTED]@tno.triskelion.nl

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|--|--|
| (Titel) Naam en voorletters | | ☐ Dhr. ☐ Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- ☒ Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- ☐ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- ☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- ☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- ☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- ☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- ☒ Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- ☒ Nee > Ga verder met vraag 3
- ☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 3 - 6 - 2015 |
| Einddatum | 3 - 6 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Dierstudies in het kader van ontwikkeling van medicijnen voor het behandelen en voorkomen van virale infecties aan de luchtwegen, in het bijzonder RSV.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Dierstudies in het kader van ontwikkeling van medicijnen voor het behandelen en voorkomen van virale infecties aan de luchtwegen, in het bijzonder RSV.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | DEC-TNO |
| Postadres | Postpunt 30, Utrechtseweg 48, 3704 HE Zeist |
| E-mailadres | ██████████@tno.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☒ Via een eenmalige incasso
- ☐ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie Proefdierdeskundige

Plaats Zeist

Datum 21 - 4 - 2015

Handtekening 



Centrale Commissie Dierproeven

Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50400
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO Triskelion
1.3	Vul de titel van het project in.	Dierstudies in het kader van ontwikkeling van medicijnen voor het behandelen en voorkomen van virale infecties aan de luchtwegen, in het bijzonder respiratoir syncytieel virus.

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond
Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën. • Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn. • Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en). • Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven. Verkoudheid is een infectie van de bovenste luchtwegen (neusholte, neusbijholten, keel en strottenhoofd) en is de meest voorkomende infectieziekte bij mensen. Er zijn verschillende soorten virussen die een verkoudheid kunnen veroorzaken, waaronder rhinovirussen (30-80%), coronavirussen (10-15%), respiratoire syncytiele virussen, adenovirussen, para-influenzavirussen, enterovirussen. Het immuunsysteem is in staat de virusinfectie op te ruimen en veroorzaakt de symptomen van verkoudheid. Tegen verkoudheid is geen medicijn beschikbaar. Na een infectie ontstaat meestal een jarenlange immuniteit voor het specifieke virus. Omdat er zoveel verschillende virussen een verkoudheid kunnen veroorzaken, worden volwassenen gemiddeld 2-5 keer per jaar verkouden, kinderen zelfs 6-12 keer per jaar. Een verkoudheid is meestal niet ernstig. Bij ouderen, jonge kinderen en mensen met een verzwakt immuunsysteem kunnen echter ernstige complicaties optreden; bijkomende bacteriële infecties kunnen zich voordoen en leiden tot keel- of bijholteontsteking of een oorinfectie. Dit projectvoorstel betreft onderzoek naar medicijnen en vaccins tegen respiratoir syncytieel virus (RSV). Van de genoemde verkoudheidsvirussen is dit de meest voorkomende omdat, in tegenstelling tot de meeste virussen, immuniteit tegen RSV niet levenslang is en dus gedurende het leven verschillende ziekte-episoden door RSV kunnen ontstaan. In zeer jonge kinderen kan besmetting met RSV leiden tot een infectie van de lagere luchtwegen (zoals de longen). RSV infectie kan in risicogroepen (premature baby's, kinderen jonger dan 2 jaar met een chronische longaandoening of hartproblemen, volwassenen ouder dan 65 en mensen met een verzwakt immuunsysteem door bijvoorbeeld een HIV-infectie, orgaantransplantatie of chemotherapie) een ernstig tot zeer ernstig verloop hebben waarbij ziekenhuisopname noodzakelijk is. RSV infecteert de epitheelcellen van de luchtwegen en het immuunsysteem is in staat het virus op te ruimen. Omdat geen levenslange immuniteit wordt opgebouwd, kunnen mensen dus meerdere keren geïnfecteerd raken met RSV. Buiten de medicijnen Ribavirin® en Synagis®, is geen vaccin tegen RSV beschikbaar. Het antivirale middel Ribavirin® blijkt in de praktijk slechts beperkt werkzaam. Voor risicogroepen (leeftijd jonger dan 2 jaar) is een preventief medicijn beschikbaar, namelijk Synagis®. Dit medicijn wordt gedurende het RSV seizoen maandelijks toegediend. Synagis® wordt alleen toegediend aan risicogroepen ter voorkoming van resistentie van RSV tegen Synagis® en vanwege de hoge kosten van de behandeling. De farmaceutische industrie richt zich op het ontwikkelen van nieuwe medicijnen om ernstige RSV infectie te kunnen behandelen

en om de potentiële langetermijneffecten (terugkerende piepende ademhaling of astma) veroorzaakt door RSV te reduceren. Daarnaast is er behoefte aan de ontwikkeling van een vaccin dat levenslange bescherming biedt.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

De farmaceutische industrie ontwikkelt medicijnen om ernstige infectie met RSV te behandelen, alsook medicijnen en vaccins die langdurige bescherming bieden tegen RSV infectie. In de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins zijn twee fasen te onderscheiden: Research & Development (R&D) en de preklinische fase. In de R&D fase worden nieuwe medicijnen/vaccins gekarakteriseerd en gescreend in diverse *ex vivo* en *in vitro* assays (zoals bijvoorbeeld binding assays en neutralisatie assays). Nieuwe medicijnen/vaccins die in deze fase effectiviteit laten zien, worden in de preklinische fase getest. Het preklinische onderzoek richt zich op de toedieningsroute, dosering, frequentie, (immunologisch) werkingsmechanisme, mogelijke bijwerkingen en de mogelijkheid tot combinatie van het nieuwe medicijn met andere therapieën (zogenaamde combinatietherapie). De resultaten van het preklinisch onderzoek worden gebruikt voor het registratiedossier dat voor toelating op de markt aan de registratieautoriteiten moet worden overlegd. Preklinisch onderzoek is o.a. gebaseerd op dierexperimenteel onderzoek. In dit project zullen kandidaten voor de behandeling van RSV in de preklinische fase worden geëvalueerd in een RSV muismodel. Hiertoe zal een gevalideerd muismodel worden ontwikkeld binnen onze instelling, waarna vaccins (profylactisch) en antivirale middelen en/of immunomodulators (therapeutisch) kunnen worden getest voor hun effectiviteit op het remmen van RSV infectie.

3.3 Belang

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

RSV infectie is een veelvoorkomende oorzaak van verkoudheid. In jonge kinderen kan RSV infectie snel overslaan naar de lagere luchtwegen en resulteren in een ernstiger verloop. Hoewel RSV infectie zelden leidt tot mortaliteit, kan een infectie in zeer jonge baby's ernstig verlopen. Volgens de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) heeft 25-40% van de voor het eerst geïnfecteerde kinderen symptomen van een bronchiolitis of een pneumonie. En voor 0.5-2% van de patiënten is ziekenhuisopname noodzakelijk (bron: Wereldgezondheidsorganisatie; WHO). Virale bronchiolitis is geassocieerd met terugkerende piepende ademhaling of astma. Het antivirale middel Ribavirin® is slechts beperkt werkzaam en preventieve behandeling met Synagis® wordt alleen gegeven aan kinderen uit risicogroepen. Synagis® moet herhaaldelijk worden toegediend tijdens het RSV seizoen en daardoor bestaat het risico dat resistentie optreedt. Daarnaast brengt dit hoge medische kosten met zich mee. Daarom wordt onderzoek gedaan naar een vaccin dat na eenmalige toediening levenslang beschermt, zonder dat resistentie optreedt. Daarnaast zoekt men ook naar een medicijn voor de therapeutische behandeling na infectie met RSV. Onderzoek naar nieuwe antivirale middelen, immuunmodulators en vaccins is dan ook noodzakelijk. Daarnaast is er ook een economisch belang: het beheersen van kosten van de gezondheidszorg. Bovendien worden de economische gevolgen van verkoudheid vaak onderschat: de kosten van voorgeschreven medicijnen, ziekmelding door mensen die verkouden zijn, ouders die niet kunnen werken omdat de kinderen ziek zijn etc.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Voor het testen van nieuwe therapieën tegen RSV maken we gebruik van een diermodel. Nieuwe medicijnen of vaccins zullen altijd in meerdere diermodellen worden getest alvorens ze worden getest in mensen. Wij maken gebruik van het muismodel. Diernodellen vormen een cruciale link tussen de

mechanistische studies *in vitro* en klinische studies in mensen. De beschikbare diersmodellen voor RSV zijn de muis, katoenrat en het schaap (Bem et al 2011, Woolums et al 2011). De katoenrat is een diersmodel die een hoge translatie heeft naar de mens. De katoenrat is daarentegen moeilijk om te hanteren en huisvesten, dieren dienen individueel te worden gehuisvest en het ongerief is daarmee ook hoger (Niewiesk et al 2002). Dit maakt het lastig om meerdere condities (zoals verschillende medicijnen, doses of toedieningsroutes) te testen in één experiment. Muizen zijn daarentegen makkelijk te hanteren en huisvesten. Daarnaast is er een breed scala aan immunologische en moleculaire reagentia beschikbaar voor de muis. Het muismodel geeft de mogelijkheid verschillende condities (zoals doseringen en toedieningsroutes) te testen in één experiment en het werkingsmechanisme in detail te kunnen onderzoeken. Dit model is daarmee zeer geschikt als een screeningsmodel, waaruit geschikte kandidaten worden geselecteerd die verder worden ontwikkeld (en getest in diersmodellen met een hogere transleerbaarheid, waaronder de katoenrat) voordat ze worden toegepast in de mens.

Het RSV muismodel zal eerst bij ons in-huis moeten worden gevalideerd. Er zijn een aantal bestaande modellen met verschillende RSV varianten, o.a. RSV-A2, RSV line19, RSV Long en andere klinische RSV varianten (Woolums et al 2011, Stokes et al 2011). De verschillen tussen de varianten uit zich in bijvoorbeeld de virale load in de longen, slijmproductie, cytokineproductie, gewichtsverlies. Aan de hand van de specifieke vraag van de opdrachtgever zal een keuze worden gemaakt voor het gebruik van het specifieke model. Wanneer een medicijn een effect heeft op de slijmproductie kan een RSV variant worden gekozen die een goede slijmproductie induceert. Indien een kandidaat medicijn met name de virusreproductie remt kan een RSV variant worden gekozen die een goede reproductie in de longen laat zien. Indien zich nieuwe onbekende RSV varianten worden ontdekt in patiënten, dan kan de vraag zijn of kandidaat medicijnen bescherming bieden tegen deze nieuwe RSV varianten. De beoogde vraagstelling van de opdrachtgever bepaalt de keuze voor de te gebruiken RSV variant. Deze vraagstelling en keuze voor een specifiek RSV model zullen worden onderbouwd in het studieplan. Het muismodel in onze instelling zal worden gebaseerd op reeds bestaande modellen beschreven in de literatuur en zal worden gevalideerd d.m.v. kinetiek analyse van de virale infectie. Voor het bepalen van de effectiviteit van een nieuw medicijn/vaccin in vervolgstudies wordt het aantal virale deeltjes (virale load) in de longen bepaald op een bepaalde dag na infectie, afhankelijk van de kinetiek van de RSV infectie en het werkingsmechanisme van het medicijn/vaccin. RSV infecteert en reproducteert in het longweefsel. De virale load in de longen piekt tussen dag 3 en 6 na infectie en is binnen circa 8 dagen opgeruimd. Het bepalen van de virale load stelt ons in staat de effectiviteit van medicijnen op de ernst van de RSV infectie te bepalen. RSV infectie van muizen kan ook effect hebben op lichaamsgewicht, klinische verschijnselen en longfunctie, en deze dienen als secundaire uitleesparameter in het diersmodel. Bij de validatie van het model zal worden bepaald wanneer de piek in de virale load is en zal het ziekteverloop in de muizen in kaart worden gebracht. Aan de hand van het ziekteverloop zullen humane eindpunten worden bepaald, hierbij wordt gedacht aan pompemde ademhaling, blauwkleuring van de slijmvliezen, gewichtsverlies van meer dan 20%.

Aansluitend zullen RSV modellen worden gebruikt voor het testen van de effectiviteit van nieuwe antivirale middelen en/of vaccins door muizen te behandelen met de nieuwe therapieën voor- of nadat ze zijn geïnfecteerd met RSV. Afhankelijk van de specifieke RSV variant die wordt gebruikt voor de infectie kan op verschillende manieren de progressie van RSV infectie worden gevolgd. De uitleesparameters zijn onder andere, maar niet beperkt tot, virale load in de longen, gewicht, klinische verschijnselen, longfunctie, slijmproductie, longpathologie en immunologische uitleesparameters. RSV infectie in muizen is een niet-lethale infectie. Afhankelijk van de onderzoeksvraag zullen de dieren worden gevolgd gedurende ongeveer een week, eventueel langer indien het herstel van infectie of het effect op de longen na langere tijd wordt bestudeerd.

Het studie design van iedere individuele studie zal conform de code of good practice (van Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001); A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes) worden uitgevoerd.

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

1) Validatie van RSV muismodellen

Als eerste zal het RSV muismodel worden opgezet en gevalideerd. Hiertoel zullen dieren intranasaal worden geïnfecteerd (challenge) met één of meerdere doses van een bepaalde RSV variant. Bij de validatie van het model zal elke dag een groep dieren worden geëuthanaseerd en de virale load in de longen worden bepaald om de kinetiek van de infectie in kaart te brengen. De virale load in de longen is de maat voor de ernst van de RSV infectie en dus de

primaire uitleesparameter om remming door therapie te evalueren. Uit de literatuur is bekend dat de piek van de virale load ligt tussen dag 3 en dag 6 post-challenge. Het validatie experiment zal uitwijzen wanneer de longen moeten worden geanalyseerd in toekomstige RSV studies. Daarnaast zal ook het ziekteverloop in de dieren in kaart worden gebracht op basis van klinische verschijnselen, zodat humane eindpunten kunnen worden bepaald (mogelijke pompemde ademhaling, blauwkleuring van slijmvlies door benauwdheid, >20% gewichtsverlies). Hierna kan het model worden gebruikt voor het testen van nieuwe medicijnen/vaccins tegen RSV.

2) Testen van medicijnen (zowel therapeutisch als profylactisch) in het RSV muismodel, zoals

- Monoklonale antilichamen

De studies die onder dit onderzoeksvoorstel vallen, zijn erop gericht om breed beschermende antilichamen te onderzoeken op profylactische of therapeutische effectiviteit in virus challenge modellen.

- Kleine eiwitten

In dit onderzoeksvoorstel worden medicijnen ontwikkeld die uiteindelijk "needle free" zullen worden toegediend.

- Small molecules

Een andere benadering is het ontwikkelen van kleine moleculen (small molecules) met als doel om een medicijn tegen RSV te ontwikkelen dat oraal kan worden toegediend.

3) Testen van vaccins in het RSV muismodel (profylactisch)

Er worden diverse vaccinmodellen voor RSV onderzocht, zoals bijvoorbeeld een verzwakt virus, virosomes of een vaccin gericht tegen de structurele eiwitten van RSV, zoals het F-, G-, N-, of M2-eiwit. Verschillende strategieën worden gebruikt om deze eiwitten na te bouwen. Vaccinvarianten die *in vitro* succesvolle binding aan RSV laten zien of remming van RSV infectie in celweek systemen, worden vervolgens getest voor effectiviteit in vivo, gevolgd door beoordeling van de door het vaccin opgewekte immunorespons. Een manier om het vaccin te verbeteren is het toevoegen van een adjuvans. Adjuvantia kunnen een significante verbetering van de immunogeniciteit van vaccins laten zien, door zowel de humorale als de cellulaire immunorespons na immunisatie te verbeteren. Het doel is hierbij vaak om superioriteit aan te tonen ten opzichte van huidige adjuvantia (b.v. alumen-gebaseerd). In klinische onderzoeken is de veiligheid van b.v. saponine houdende vaccins aangetoond en is de immunorespons na vaccinatie verbeterd.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Voordat een van bovenstaande nieuwe therapieën kan worden getest zal eerst het te gebruiken RSV diemodel in de muis worden gevalideerd. Bij het opzetten van het model met de betreffende RSV variant wordt het verloop van de virale load in de longen en het ziekteverloop van de dieren in kaart gebracht. Op basis hiervan wordt in vervollexperimenten de dag voor isolatie van de longen bepaald en kunnen tevens humane eindpunten in kaart worden gebracht. Na het opzetten van een gevalideerd diemodel, zullen nieuwe medicijnen/vaccins worden getest, na profylactische en/of therapeutische toediening. De antivirale middelen of vaccins die RSV infectie remmen in het muismodel, zijn veelbelovende kandidaten voor verdere ontwikkeling en zullen ook in andere diemodellen (waaronder de katoenrat) worden getest.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.	
Volgnummer	Type dierproef
1	Respiratoir syncytieel virus (RSV) infectiemodel in muizen
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO Triskelion	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3.4.4.1	Respiratoir syncytieel virus (RSV) infectiemodel in muizen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor het testen van de effectiviteit van nieuwe antivirale middelen en vaccins zal gebruik worden gemaakt van een RSV muismodel. Het muismodel is een veelvuldig gebruikt model voor onderzoek naar RSV. De voordelen van muizen t.o.v. andere RSV diermodellen als katoenrat en schaap zijn de beschikbaarheid van reagentia voor de muis, verkrijgbaarheid en huisvesting van muizen (Bem et al 2011, Woolums et al 2011). Ondanks dat het een heteroloog model is, omdat de muis geen natuurlijke gastheer is voor humaan RSV, is RSV wel in staat de epitheelcellen in de longen te infecteren en daar te repliceren. Het aantal virale deeltjes (i.e. virale load) in de longen piekt tussen dag 3 en 6 en is na circa 8 dagen opgeruimd. Het herstel van het longweefsel zelf duurt echter langer en kan tot 14 dagen na initiële infectie duren (Mejías et al 2004). De muis vertoont over het algemeen milde klinische verschijnselen,

zoals pilo-erectie, benauwdheid en gewichtsverlies, maar de infectie kan ook zonder klinische symptomen verlopen. Daarom zijn klinische symptomen niet geschikt als primaire parameter om RSV infectie te monitoren, maar de gezondheid van de muizen zal wel nauwkeurig worden gevolgd. Virale load in de longen is de primaire uitkomstparameter voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe medicijnen en vaccins gericht tegen RSV. Deze nieuwe medicijnen/vaccins kunnen de virusreproductie in de longen (direct of indirect) remmen. Afhankelijk van de te gebruiken RSV variant en de vraagstelling kunnen secundaire uitkomstparameters worden geanalyseerd zoals, maar niet beperkt tot, longfunctie, slijmproductie en longpathologie. Voordat nieuwe medicijnen of vaccins kunnen worden getest zal eerst het RSV muismodel (zoals beschreven in de literatuur) binnen onze instelling worden gevalideerd. Na het valideren van het muismodel, kan dit model gebruikt worden voor het testen van nieuwe medicijnen/vaccins. Voor het opzetten van het RSV muismodel zullen muizen intranasaal worden geïnfecteerd met RSV. Er is voor intranasale toediening gekozen omdat dit de natuurlijke route van infectie is bij de mens. De RSV infectie in muizen is een niet-lethaal model met over het algemeen milde klinische verschijnselen. De primaire uitleesparameter is de virale load in de longen. Daarnaast zullen de muizen dagelijks worden gewogen en worden geobserveerd voor het optreden van klinische verschijnselen. Bij de validatie van het muismodel zullen muizen intranasaal worden geïnfecteerd met RSV waarna op aangegeven dagen een groep muizen wordt geëuthanaseerd en de virale load in de longen wordt bepaald. Dit zal bepalen wat de kinetiek is van de virale load na infectie. Deze validatiestudie zal ook worden gebruikt voor het uitvoeren van een statistische power-analyse voor opvolgende studies. Wanneer het model is gevalideerd kunnen nieuwe medicijnen/vaccins worden getest in het muismodel. Daartoe zullen muizen worden behandeld met één of meerdere doses van nieuwe medicijnen/vaccins. Tevens zal altijd een negatieve en positieve controlegroep (Synagis® of een andere werkzame stof) worden meegenomen. Muizen zullen een RSV infectie (challenge) krijgen op dag 0. Behandeling kan plaatsvinden op een of meerdere dagen voor- of nadat de dieren een RSV challenge krijgen. Dit wordt nader gespecificeerd in het studieplan. De dieren worden gevolgd voor een periode van 8 dagen, tenzij anders aangegeven in het studieplan. In het studieplan zal worden gespecificeerd welke medicijnen/vaccins en welke doseringen de muizen krijgen toegediend, hoe lang de studie duurt en of naast virale load ook secundaire uitleesparameters worden gebruikt.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

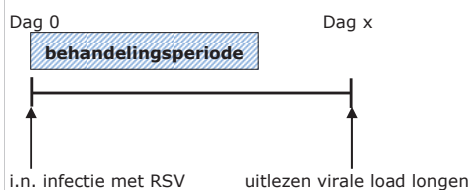
In een validatiestudie zal een grote groep muizen op dag 0 intranasaal worden geïnfecteerd met een bepaalde RSV variant. Klinische verschijnselen en lichaamsgewicht worden gevolgd om ziekte door RSV in kaart te brengen en de humane eindpunten te bepalen. Op basis van literatuur is bekend dat virale load in de longen tussen dag 3 en 6 na infectie maximaal is, waarna het virus wordt opgeruimd. Om te bepalen wat de kinetiek van RSV infectie in het te valideren model is, zullen op elke dag 5 geïnfecteerde muizen worden geëuthanaseerd om de virale load in de longen te bepalen. De uitkomsten van deze validatiestudie zullen worden gebruikt om te bepalen op welke dag/dagen de virale load in vervolgstudies gemeten moet worden om de effectiviteit van medicatie te kunnen waarnemen. Door 5 muizen per tijdstip te gebruiken, kan spreiding tussen de muizen op een betrouwbare manier in kaart worden gebracht. De resultaten van de validatiestudie worden vervolgens gebruikt voor de statistische power-analyse voor volgende studies.

De primaire uitleesparameter voor het testen van effectiviteit van nieuwe medicijnen/vaccins tegen RSV is de virale load in de longen. Daarnaast zullen ook klinische verschijnselen en lichaamsgewicht worden geanalyseerd. Afhankelijk van de vraagstelling in de studie zal een behandelingsstrategie met de (nieuwe) medicijnen worden opgesteld (door experts binnen het projectteam) en dit kan per studie variëren. Mogelijke variaties zijn: tijdstip van toediening, bijvoorbeeld profylactisch of therapeutisch (of een combinatie hiervan), éénmalig versus herhaalde toediening (met verschillen in tijdsduur van de intervallen tussen de toedieningen), toediening van combinaties van medicijnen, route van toediening (waaronder oraal, intranasaal, intramusculair, intratracheaal, intraveneus, intradermaal, subcutaan en sublinguaal, conform de code of good practice (van Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001))). Het finale studie design wordt door het project team (bestaande uit interne en externe experts) bepaald en (statistisch) onderbouwd en deze informatie dient als basis voor het studieplan van elke studie. Het studieplan zal verder alle details beschrijven die nodig zijn voor een goede ethische beoordeling, zoals doel van de proef,

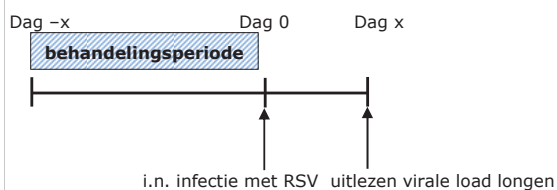
wetenschappelijke achtergrond, onderbouwing van de groepsgrootte, de RSV stam, beschrijving (statistische) analyse van studie data etc.

De proefopzet wordt bepaald door het te testen medicijn of vaccin. Wanneer medicijnen voor therapeutische behandeling worden getest, zal de behandeling plaatsvinden in de periode nadat de dieren zijn geïnfecteerd met RSV. Wanneer een profylactische behandeling met een vaccin of medicijn wordt uitgevoerd, zal de behandeling altijd plaatsvinden voordat de dieren worden geïnfecteerd met RSV. De positieve controle groep zal worden behandeld met een bestaand medicijn b.v. Synagis® of een andere stof met een bekende positieve werking. Als negatieve controle zullen muizen worden behandeld met de vehicle (drager) van de te testen medicijnen/vaccins. Omdat alle groepen worden vergeleken met de negatieve controlegroep zal de grootte van deze groep zo worden gekozen dat voldoende power wordt verkregen wanneer deze groep meerdere keren wordt gebruikt in de statistische analyse. Een schematische weergave van therapeutische en profylactische behandeling is hieronder aangegeven (N.B. het uiteindelijke design zal worden gespecificeerd in het studieplan).

Studie met therapeutische behandeling:



Studie met profylactische behandeling:



De biotechnische handelingen die toegepast worden in de challenge fase zijn dezelfde voor elke studie en worden hier onder beschreven:

Op dag 0 van de studie krijgen alle dieren een intranasale challenge met een dosis van x PFU (plaque forming units) van de geselecteerde RSV variant. RSV wordt intrasaaal toegediend onder narcose, om zowel de neus, trachea en longen (bovenste en onderste luchtwegen) te kunnen infecteren. De dieren zullen

onder anesthesie worden gebracht middels een voor het dier en model passend middel conform de code of good practice (van Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001)) en nader worden gespecificeerd in het studieplan. Na toediening van anesthesie krijgen de dieren 50 µL RSV toegediend, verdeeld in gelijke volumes van 25 µL per neusgat m.b.v. een pipet. De dieren worden op hun rug gehouden met het hoofd en de neus omhoog en 25 µL wordt toegediend aan het eerste neusgat. Nadat dit volledig is ingeademd, wordt op dezelfde manier de andere 25 µL in het tweede neusgat toegediend. De dieren worden nog in deze oriëntatie gehouden gedurende 15 seconden na doseren om ervoor te zorgen dat de gehele dosering wordt ingeademd. Voor het doseren van elk dier wordt een nieuwe, schone pipetpunt gebruikt.

De dieren worden gedurende een periode van ongeveer een week (gebaseerd op de resultaten van de validatiestudie en de vraagstelling, verder gespecificeerd in het studieplan) na infectie geobserveerd waarin lichaamsgewicht en klinische verschijnselen worden geregistreerd. (N.B.: indien het studiedesign het toelaat zullen de formuleringen met de medicijnen worden gecodeerd, zodat de biotechnici de studie dieren geblindeerd kunnen observeren). In iedere studie zal zowel een positieve als een negatieve controle groep worden meegenomen. De positieve controlegroep zal tijdens de behandelingsfase worden behandeld met Synagis®, of bij voortschrijdend inzicht een ander werkzaam middel. De negatieve controlegroep zal worden behandeld met vehicle (de drager van de te testen medicijnen).

Observaties en metingen

De observatie van klinische verschijnselen en lichaamsgewicht zal worden uitgevoerd volgens verschillende regimes afhankelijk van de pre- en post-infectiefase van de studie. De klinische verschijnselen ten gevolge van de RSV infectie kunnen de volgende zijn: benauwdheid, pilo-erectie, gebogen houding. Omdat de virale load in de longen piekt tussen dag 3 en 6 na infectie, zullen de klinische verschijnselen naar verwachting hiervoor zichtbaar zijn, omdat de ademhaling kan worden bemoeilijkt zodra door RSV infectie het longweefsel beschadigd raakt.

Klinische verschijnselen

Pre-infectie

Individuele dieren zullen worden geobserveerd voor het optreden van reacties op behandelingen alsook tekenen van ziekte of sterven. Observaties worden minstens eenmaal per dag uitgevoerd van de dag van indeling in de studie tot dag 0 (dag van infectie).

Post-infectie

Individuele dieren zullen worden geobserveerd voor het optreden van reacties op behandelingen alsook tekenen van ziekte of sterven. Observaties worden eenmaal of tweemaal per dag uitgevoerd (overdag, met een tijdsinterval van minstens 5 uur) afhankelijk van de resultaten uit de validatie studie(s), vanaf de dag van infectie tot het einde van de studie. Alle observaties, inclusief gedrag en individuele afwijkingen worden geregistreerd.

Lichaamsgewicht

Pre-infectie

Kort voor start van de studie zal voor elk dier het lichaamsgewicht worden bepaald, voor het indelen van dieren in de groepen. Dieren worden wekelijks gewogen van dag -x (voor doseren) tot dag 0 (voor infectie).

Post-infectie

Van dag 0 tot einde van de studie worden dieren dagelijks in de ochtend gewogen.

Bloedafname

Indien nodig wordt op bepaalde tijdstippen bloed afgenomen van geselecteerde groepen (details worden beschreven in het studieplan). Bloed zal worden afgenomen conform de code of good practice (van Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001)).

Euthanasie

De dieren worden geëuthanaseerd conform de code of good practice of een andere geaccepteerde methode uit richtlijn 2010/63/EU, bijlage IV. De longen zullen worden gespoeld voor het verkrijgen van broncho-alveolaire lavage en de longen zullen worden ingevroren voor het analyseren van de virale load en/of pathologie (details worden beschreven in het studieplan).

Biotechnische handelingen gerelateerd aan behandeling met (nieuwe) medicijnen

Overige handelingen, die specifiek zijn voor de behandeling met (nieuwe) medicijnen zullen voor iedere individuele studie in het studieplan worden beschreven, inclusief de inschatting van het ongerief door deze handelingen. Naar verwachting zal het totale ongerief per proefdier door RSV infectie (benauwd worden, maximaal matig ongerief) niet wordt verhoogd door deze 'overige' handelingen.

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

Het aantal dieren in de validatiefase (5 muizen per tijdstip) komt overeen met beschrijvingen uit de literatuur (Mejías et al 2005, Lukacs et al 2006, Olszewska et al 2011, Mejías et al 2011). Als uit de validatiestudies blijkt dat dit aantal onvoldoende power geeft, zal dit worden aangepast in de vervolgstudies en nader worden toegelicht in het studieplan. Omdat alle groepen worden vergeleken met de negatieve controlegroep zal de grootte van deze groep zo worden gekozen dat voldoende power wordt verkregen wanneer deze groep meerdere keren wordt gebruikt in de statistische analyse.

B. De dieren

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

Voor het muismodel wordt bij voorkeur gebruikt gemaakt van vrouwelijke BALB/c muizen. Vrouwelijke BALB/c muizen worden wereldwijd gebruikt voor studies met RSV en RSV infectie verloopt efficiënter in BALB/c muizen t.o.v. C57BL/6 muizen. Daar waar het noodzakelijk is om een andere muizenstam te gebruiken zal dit in het studieplan worden toegelicht.

Tenzij anders vermeld in het studieplan, zullen muizen van 6-8 weken oud bij aanvang van de studie worden gebruikt. Het totaal aantal dieren per studie kan variëren en is afhankelijk van het aantal groepen en de groepsgrootte. Het aantal groepen in een studie wordt bepaald door de vraagstelling en de groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de validatiestudie. Gebaseerd op een verwacht aantal studies van 10-12 per jaar met 80-150 dieren wordt het maximaal aantal dieren op maximaal 9000 geschat over een periode van 5 jaar (12 studies x max. 150 dieren x 5 jaar).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

De medicijnen die in RSV muismodellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van *in vitro/ex vivo* efficacy experimenten. Alternatieven voor het nabootsen RSV infectie, bijvoorbeeld d.m.v. cel- of weefselkweek leveren een incompleet beeld van de effectiviteit van nieuwe medicijnen/vaccins. Het immuunsysteem is een dynamisch complex netwerk van diverse cellen en mediators. Bij RSV infectie heeft het immuunsysteem interactie met RSV en met het omringende longweefsel. Het is vooralsnog onmogelijk dit volledig na te bootsen *in vitro* of in "lagere" diersoorten. Vermindering van het aantal dieren kan op termijn aan worden gedacht als blijkt dat variatie binnen de groepen zeer klein is. Hierbij moet gedacht worden aan verkleinen van groepsgrootte. Daarnaast kunnen nieuwe ontwikkelingen in technieken zorgen voor verfijning van het model, daarbij wordt gedacht aan bijvoorbeeld non-invasieve imaging methodes.

Met behulp van statistiek wordt bepaald wat de optimale groepsgrootte is in deze experimenten, zodat met minimale hoeveelheid proefdieren de onderzoeksvraag kan worden beantwoord.

De proefdierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd protocol en door getrainde medewerkers. Hierdoor kent de dierproef een maximale kwaliteit, en worden stress en ongemak voor de proefdieren zo laag mogelijk gehouden. De RSV infectie kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de muizen en daarom wordt hun gezondheid dagelijks gecontroleerd. Er zijn heldere afspraken om het ongerief voor de dieren zo veel mogelijk in te perken, muizen die meer dan matig ongerief ondervinden, worden uit de proef genomen op basis van de humane eindpunten die in de validatiestudie worden bepaald.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Er zal anesthesie worden toegepast bij de muizen conform de code of good practice (van Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001)).

De kans op nadelige milieueffecten worden beperkt door de experimenten uit te voeren onder biosafety level 2 (BSL-II) condities i.v.m. het gebruik van RSV varianten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t. dit is geen wettelijk vereist onderzoek

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Eénmalige intranasale toediening van RSV onder verdoving: licht ongerief

Benauwd worden als gevolg van de RSV infectie: matig ongerief

Dagelijks wegen: licht ongerief

Behandeling met teststof: maximaal matig ongerief

Evt een of meermalen afnemen van bloed: licht ongerief

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

RSV infecteert het longweefsel, waardoor dit beschadigd raakt en het ademen kan worden bemoeilijkt en de dieren benauwd kunnen worden.

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

Er worden geen maatregelen genomen om deze effecten te voorkomen. De benauwdheid dient als (secundaire) uitleesparameter.

Wanneer er dieren zijn die door verzwakking niet meer bij voer/water kunnen, worden voerkorrels en hydrogel (steriel water gel voor hydratatie (98% puur

water) op de bodem van de kooi aangeboden.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het optreden van zeer ernstige benauwdheid, dit wordt bepaald aan de hand van pompende ademhaling en/of blauwkleuring van de slijmvliezen.

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

In de validatiefase zal dit naar verwachting niet meer dan 20% zijn. De infectiedosis en dag van euthanaseren worden zo gekozen dat in de fase van testen van medicijnen naar verwachting minder dan 5% deze criteria halen.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

De negatieve controlegroep zal benauwd worden ten gevolge van de RSV infectie, door de moeizamere ademhaling wordt dit ingeschat op matig ongerief. De positieve controle groep kent licht ongerief, doordat Synagis® virale infectie remt. De groepen behandeld met teststof zullen naar verwachting licht **tot** **matig** ongerief ondervinden. Naar verwachting zal ongeveer 50% van de dieren licht ongerief en 50% matig ongerief ondervinden.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De primaire uitleesparameter is virale load in de longen, waarvoor de longen worden geïsoleerd na euthanaseren van de dieren.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
2. Titel van het project: Dierstudies in het kader van ontwikkeling van medicijnen voor het behandelen en voorkomen van virale infecties aan de luchtwegen, in het bijzonder respiratoir syncytieel virus.
3. Titel van de NTS: Dierstudies in het kader van ontwikkeling van medicijnen voor het behandelen en voorkomen van virale infecties aan de luchtwegen, in het bijzonder respiratoir syncytieel virus.
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC-TNO
 - telefoonnummer contactpersoon: 088 [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC 25-3-2015
 - ☐ aanvraag compleet NVT
 - ☒ in vergadering besproken op 1-4-2015
 - ☒ anderszins behandeld 10-4-2015 (emailronde) en 17-4-2015 (emailronde)
 - ☒ termijnonderbreking(en) van 3-4-2015 tot 10-4-2015 en 16-4-2015 tot 17-4-2015
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen NVT
 - ☒ aanpassing aanvraag versie nummer (3)
 - ☒ advies aan CCD 21-4-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum **1-4-2015**
 - Plaats **Leiden**
 - Aantal aanwezige DEC-leden **6 (inclusief voorzitter)**

- Aanwezige (namens) aanvrager **Verantwoordelijk Onderzoeker**
- Strekking van de vraag / vragen:

De volgende vragen zijn mondeling bediscussieerd met de verantwoordelijk onderzoeker en vervolgens in twee email rondes beantwoord.

1. **Hoe verhoudt zich de data uit een muismodel in het traject van de ontwikkeling van een vaccin en/of een medicijn bij/tegen een RSV infectie?**
2. **Welke modellen zijn er voor onderzoek naar RSV? Wat zijn de voor en nadelen van elk, en waarom wordt in dit geval voor de muis gekozen? Denk hierbij ook aan de translatie naar de mens.**
3. **Wat bepaalt de keuze van een bepaalde RSV variant en wat bepaalt welke groepen nodig zijn om een goed resultaat te mogen verwachten?**
4. **Bij de keuze van de viral load meting op de hoogst te verwachten dag, wordt er rekening gehouden met een eventuele verschuiving van de piek?**
5. **Wat is de strategie voor het bepalen van de proefopzet en het te gebruiken aantal dieren?**

- Strekking van het (de) antwoord(en)

Zie vraag 8

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

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum **3-4-2015 en 16-4-2015**
- Strekking van de vraag / vragen **Zie punt 7 horen aanvrager**
- Datum antwoord **10-4-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en)

1. De onderzoeker heeft de plaats van de muis in de ontwikkeling van medicatie en vaccins nu duidelijk beschreven in het projectvoorstel. Het is de DEC helder dat alleen stoffen die effectief blijken in de ex vivo en in vitro assays, getest worden in één of meerdere muizenstudies. Bij effectieve stoffen in de muizenstudies zal nog een vervolg fase in diermodellen (muis of andere) nodig zijn om de stof weer een stap verder te brengen in de ontwikkeling van een medicijn of vaccin.
 2. De onderzoeker heeft meer inzicht gegeven in de voor en nadelen van de verschillende diermodellen in de projectaanvraag. Het is de DEC nu duidelijk waarom in deze screeningsfase muizen worden ingezet om te bepalen welk medicijn of vaccin in aanmerking komt voor verdere ontwikkeling richting de kliniek.
 3. De onderzoeker heeft in de projectaanvraag gespecificeerd hoe de keuze voor de RSV variant en de proefopzet wordt bepaald door de onderzoeksvraag en het te testen medicijn of vaccin van de opdrachtgever.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag **Ja**
 - Datum 2^e antwoord **16-4-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en) **De DEC heeft in een 2e email ronde een adequaat antwoord op de vragen 4 en 5 gekregen.**
4. De onderzoeker neemt de suggestie van de DEC over in de projectaanvraag en verklaart dat op basis van het werkingsmechanisme zal worden bepaald of het noodzakelijk is op één of meerdere dagen de virale load te bepalen.
 5. De onderzoeker heeft de statistische strategie aangepast in het projectvoorstel. Het studiedesign hangt af van de fase van ontwikkeling van het medicijn of het vaccin. Het werkingsmechanisme bepaalt hoeveel verschillende groepen meegenomen moeten worden. Daarmee begrijpt de DEC dat de

grove schatting, van 80-150 dieren per studie, zowel de validatie (met verschillende tijdstippen) en het uiteindelijke experiment bevat. De DEC is ervan overtuigd dat op het moment dat bij het indienen van het studieplan het design goed getoetst kan worden door de IvD.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag **JA**

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **NVT**

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
3. De DEC is competent om hierover te adviseren **Ja**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.

Alle leden hebben allen onafhankelijk en onpartijdig deel kunnen nemen aan de advisering mbt het betreffende project

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- ☒ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
- ☐ uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
- ☐ uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
- ☐ wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en)

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een **substantieel** belang.

De DEC heeft uitgebreid gediscussieerd over het belang van deze aanvraag. Belanghebbende in dit onderzoek zijn de patiënten en hun familie. Zij hebben een belang met betrekking tot hun welzijn en het behandeld kunnen worden tegen RSV. Andere belanghebbende van dit project zijn gezonde mensen. Voor gezonde mensen is er een belang om niet ziek te worden. Is het belang van de uitkomst van dit project vooral een belang voor gezonde mensen die daardoor uiteindelijk minder last hebben van verkoudheid of is het belang voornamelijk voor risicogroepen in de samenleving voor wie een RSV infectie tgv bacteriële complicaties een ernstig tot dodelijk ziekteverloop tot gevolg kan hebben. Uiteindelijk is de DEC unaniem eens geworden dat het totaal belang substantieel is, met daarbij doorslaggevend dat een RSV infectie voor jonge kinderen zelfs tot ziekenhuisopname kan lijden en dat de huidige beschikbare medicatie beperkingen heeft. Daardoor schat de DEC het belang van het onderzoek doen naar nieuwe medicatie mogelijkheden tegen en ter behandeling van RSV van substantieel belang is.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project

De onderzoekers hebben ervaring met het opzetten van infectiemodellen. Zij beschrijven dat het model in-huis gevalideerd moet worden, dat er verschillende RSV varianten zijn en dat de modelkeuze afhankelijk is van de vraag van de opdrachtgever. Na een vraag van de DEC blijkt dat de testfase in het muizenmodel onderdeel is van een hele keten van experimenten die al plaatsgevonden hebben voorafgaand aan dit onderzoek en ook nog plaats zullen vinden na dit project om daarmee de potentiële medicijnen en vaccins dichterbij de klinische toepassing te brengen. Daardoor is de vraag van de opdrachtgever de aanleiding voor het valideren van en het testen in een muizenmodel. Bij het opzetten van de ziektemodellen wordt rekening gehouden met de belangrijkste parameters die gemeten moeten worden in het model op basis van de verwachte werkzaamheid van de medicijnen of vaccin. Daarnaast worden zowel positieve als negatieve controle groepen meegenomen om de werking tegen af te kunnen zetten. Ook wordt er doormiddel van een grotere controle groep een hogere power behaald bij het afzetten van meerdere proefgroepen tegen de controles. De DEC is er van overtuigd dat met deze strategie en de expertise van de onderzoekers het mogelijk is om binnen de gestelde termijn medicijnen en vaccins te testen tegen het RSV virus in een muizenmodel.

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd **NVT**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geëvalueerd

Het ongerief is door de onderzoeker ingeschat als licht voor de helft van de dieren en matig voor de andere helft van de dieren. De DEC is van mening dat dit een realistische inschatting is. De dieren die licht ongerief ondervinden zullen behandeld worden met medicatie en er zullen kort durende biotechnische handelingen aan de dieren gedaan worden zoals bloedafname. De dieren die matig ongerief ondervinden zullen naast medicatie of controle behandeling ook een infectie ondergaan. Bekend is dat het RSV virus in de muis geen ernstig verloop heeft, maar de dieren zullen wel benauwd kunnen zijn. De dieren die ziek kunnen worden, worden derhalve dagelijks gemonitord om zo te voorkomen dat de dieren meer dan matig ongerief ondervinden.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. **Nee**

Het is in dit stadium van medicatie en vaccin ontwikkeling van belang om potentiële compounds te testen in een levend dier met een intact immuunsysteem. Het testen van de compounds gebeurt voor of na het toedienen van een infectie om de werking van deze medicatie of vaccins in vivo te kunnen beoordelen. Uit de strategie blijkt dat dit onderzoek onderdeel is van een keten waarin voor deze in vivo stap al in vitro screenings methoden zijn toegepast.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

De DEC is van mening dat het aantal dieren welke nodig zijn voor het uittesten van een potentieel medicijn of vaccin realistisch is. De

inschatting van het totale aantal dieren op basis van de marktvraag is lastig in te schatten maar een mogelijk scenario. Er worden voldoende extra dieren aangevraagd voor validatie van het model en eventuele uitval. De DEC acht het aantal daarvoor gevraagde dieren voldoende onderbouwd. Daarnaast zullen alleen de dieren gebruikt worden die daadwerkelijk nodig zijn, als er geen marktvraag is dan worden de dieren ook niet gebruikt.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten

De DEC is van mening dat het project in overeenstemming is met de vereisten ten aanzien van de verfijning van dierproeven. Er wordt veel aandacht besteed aan de Humane Eindpunten en de consensus documenten met betrekking tot goede praktijk van het doen van dierproeven worden veelvuldig gebruikt.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd

De DEC is van mening dat de NTS een zeer goede weergave is van het project, maar de formulering is op sommige punten wat lang en lastig (bijvoorbeeld de titel).

D. Ethische afweging

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren (niet), de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt (niet) gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project (geen) voordelen opleveren voor

mens, dier of milieu

Op grond van de onder C genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk werken naar medicatie en vaccins tegen het RSV virus substantieel is en opweegt tegen het lichte en/of matige ongerief dat maximaal 150 dieren per potentiële medicatie of vaccin in dit onderzoek zullen ondervinden. De DEC acht vertaling van de resultaten naar de mens in de volledige lijn van dergelijk onderzoek mogelijk. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het gebruik van de dieren in dit project gerechtvaardigd is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag
- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens een ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-minderheidsstandpunt

Het advies is gebaseerd op consensus.



Centrale Commissie Dierproeven

Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Dierstudies in het kader van ontwikkeling van medicijnen voor het behandelen en voorkomen van virale infecties aan de luchtwegen, in het bijzonder Respiratoir syncytieel virus
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Verkoudheid; virale infectie; respiratoir syncytieel virus; vaccins; antivirale middelen

2 Categorie van het project

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

[

3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Respiratoir syncytieel virus (RSV) is één van de virussen die een verkoudheid kunnen veroorzaken. Verkoudheid is een aandoening van de bovenste luchtwegen (neusholte, neusbijholten, keel en strottenhoofd) en is de meest voorkomende infectieziekte bij mensen. Bij ouderen, jonge kinderen en mensen met een verzwakt afweersysteem kunnen ernstige complicaties optreden; bijkomende bacteriële infecties kunnen leiden tot een keel-, bijholte- of oorontsteking. In zeer jonge kinderen kan besmetting met RSV leiden tot een ontsteking van de lagere luchtwegen (zoals de longen). RSV infectie kan in risicogroepen (vroeggeboren baby's, kinderen jonger dan 2 jaar met een chronische longaandoening of hartproblemen, volwassenen ouder dan 65 en mensen met een verzwakt afweersysteem door bijvoorbeeld een HIV-infectie, orgaantransplantatie of chemotherapie) een ernstig tot zeer ernstig verloop hebben waarbij ziekenhuisopname noodzakelijk is. Omdat geen levenslange immuniteit tegen RSV wordt opgebouwd, kunnen mensen meerdere keren geïnfecteerd raken. Er zijn twee medicijnen beschikbaar waarvan één in de praktijk slechts beperkt werkzaam is . Het andere medicijn wordt alleen gegeven aan risicogroepen (leeftijd jonger dan 2 jaar) ter voorkoming van resistentie van RSV en vanwege de hoge kosten van de behandeling. Er is dus behoefte aan nieuwe medicijnen die in staat zijn een ernstige infectie te behandelen en aan medicijnen of vaccins om te voorkomen dat infecties kunnen aanslaan (preventieve bescherming). Voordat nieuwe medicijnen kunnen worden getest in mensen, moet de effectiviteit en veiligheid eerst getest worden in dieren. Hiertoe zal een RSV muismodel worden ontwikkeld binnen onze instelling. Met dit model kan de beschermende werking van vaccins en therapeutische werking van antivirale middelen tegen RSV infectie onderzocht worden. De muizen zullen worden behandeld met de nieuw ontwikkelde vaccins of antivirale middelen voor- (preventieve bescherming) of nadat (therapeutische behandeling) ze RSV krijgen toegediend. Het effect van de preventieve of therapeutische behandeling op de RSV infectie zal worden bepaald door de hoeveelheid virus in de longen van de muizen te bepalen.
-----	---	---

[

3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	De proefdierstudies die worden uitgevoerd, leveren een belangrijke bijdrage aan de ontwikkeling van medicijnen voor de behandeling van en vaccins voor de bescherming tegen virale infecties aan de luchtwegen, zoals RSV. Nieuwe medicijnen die na toediening aan de muizen een verlaging van de hoeveelheid virus in de longen laten zien, zijn potentiële kandidaten voor verdere ontwikkeling voor toepassing in de mens.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Naar schatting zullen we per experiment maximaal 150 muizen gebruiken.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De dieren zullen worden geïnfecteerd met RSV. De behandelingen die de dieren krijgen, zullen hooguit licht ongerief veroorzaken. Het ongerief dat de dieren ondervinden door benauwdheid ten gevolge van de RSV infectie wordt ingeschat op matig. Wanneer dieren worden behandeld met een medicijn of vaccin wat in staat is de RSV infectie te remmen of voorkomen, zal het ongerief lager zijn.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	50% licht ongerief, 50% matig ongerief
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren worden op humane manier gedood voor het bepalen van de hoeveelheid virus in de longen.

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen	Alternatieven voor het nabootsen van de effecten op RSV door middel van celkweek in 'kweekbakjes' (in vitro) geven geen compleet beeld om de effectiviteit van nieuwe medicijnen en vaccins te kunnen beoordelen. Het afweersysteem is een ingewikkeld netwerk van diverse cellen en omgevingsfactoren. Het is vooralsnog onmogelijk dit volledig na te bootsen in vitro. Voor het onderzoeken van het effect van nieuwe medicijnen en vaccins op de RSV infectie is een volledig functioneel afweersysteem nodig en kan daarom alleen in levende dieren uitgevoerd worden.
-----	--	---

[

worden.

4.2 **Vermindering**

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

Met behulp van statistiek wordt bepaald wat de optimale groepsgrootte is in deze studies, zodat met minimale hoeveelheid proefdieren de onderzoeksvraag kan worden beantwoord.

4.3 **Verfijning**

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

Voor het testen van de effectiviteit van nieuwe antivirale middelen en vaccins zal gebruik worden gemaakt van een RSV muismodel. Diermodellen vormen een cruciale link tussen de mechanistische studies die in vitro worden uitgevoerd en klinische studies in mensen. Het testen van nieuwe medicijnen of vaccins gebeurt in meerdere diersoorten omdat ieder diersoort andere waardevolle informatie geeft. De voordelen van muizen t.o.v. andere RSV diersoorten zoals de katoenrat en het schaap zijn verkrijgbaarheid en praktische huisvesting van muizen. Het muismodel leent zich uitstekend voor het testen van meerdere condities. Ondanks dat de muis geen natuurlijke gastheer is voor RSV, is het virus in staat de cellen in de longen te infecteren en zich daar te vermenigvuldigen. De muis vertoont over het algemeen milde ziekteverschijnselen.

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

De proefdierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd protocol en door getrainde medewerkers. Hierdoor kent de diersoort een maximale kwaliteit, en worden stress en ongemak voor de proefdieren zo laag mogelijk gehouden. De RSV-infectie kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de muizen en daarom wordt hun gezondheid dagelijks gecontroleerd.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Becoördeling achteraf



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO Triskellon BV

Postbus 844
3704 HE Zeist

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
[AVD504002015107](#)

Uw referentie

Bijlagen

Datum 23 April 2015
Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte [REDACTED]

Op 21 April 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "Dierstudies in het kader van ontwikkeling van medicijnen voor het behandelen en voorkomen van virale infecties aan de luchtwegen, in het bijzonder RSV" met aanvraagnummer AVD504002015107.

Welke informatie nog nodig

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

-U geeft in de bijlage beschrijving dierproeven aan dat de muis over het algemeen slechts milde klinische verschijnselen, zoals pilo-erectie, benauwdheid en gewichtsverlies, vertoont en dat de infectie ook zonder klinische symptomen kan verlopen. U geeft ook aan dat klinische symptomen daarom niet geschikt zijn als primaire parameters om RSV infectie te monitoren in de muis. Om de geschiktheid van de door u gekozen diersoort, de muis, te kunnen beoordelen, wordt u verzocht toe te lichten in hoeverre de muis, gezien de beperkte klinische verschijnselen en de mate van virusreplicatie, gebruikt kan worden om het effect van specifieke medicijnen op het door RSV geïnduceerd klinisch fenotype te bestuderen.

- In de bijlage beschrijving dierproeven geeft u aan dat u mogelijk gebruik wilt maken van andere muizenstammen. U geeft echter ook aan dat RSV infectie efficiënter verloopt in BALB/C muizen dan andere muizenstammen. Om inzicht te krijgen in de geschiktheid van het door u gekozen modelsysteem en de haalbaarheid van uw project, wordt u verzocht toe te lichten op basis van welke criteria u zult besluiten gebruik te maken van een andere muizenstam. U wordt ook verzocht de bruikbaarheid van alternatieve muizenstammen toe te lichten en deze te specificeren.

-U geeft in de bijlage beschrijving dierproeven aan dat bij voorkeur gebruik wordt gemaakt van vrouwelijke muizen. Om inzicht te krijgen in de hoeveelheid in

voorraad gedode dieren, wordt u verzocht aan te geven waarom geen gebruik gemaakt kan worden van mannelijke muizen en in hoeverre de mannelijke muizen in voorraad gedood zullen worden.

Datum
23 April 2015
Onze referentie
AVD504002015107

-U geeft aan dat per studie tussen de 80 en 150 dieren nodig zijn. Om, in het kader van vermindering, inzicht te krijgen in de totstandkoming van dit aantal, wordt u verzocht, voor elke vraagstelling, de verschillende groepen te beschrijven.

-U geeft aan dat u verschillende RSV varianten wilt gaan gebruiken die elk een ander klinisch fenotype induceren. Om de haalbaarheid van uw project en het cumulatieve ongerief van de dieren te kunnen beoordelen, wordt u verzocht aan te geven voor welk doel u welke variant wilt gaan gebruiken. U wordt tevens verzocht aan te geven, op basis van de literatuur, welke klinische fenotypes de te testen varianten hebben en in hoeverre deze verschillende fenotypes zullen leiden tot meer of minder ongerief bij de dieren.

-U geeft, in de bijlage beschrijving dierproeven, aan dat u, afhankelijk van de vraagstelling, verschillende secundaire parameters wilt bestuderen. Ook geeft u aan dat er, indien noodzakelijk, 'overige' handelingen zullen worden uitgevoerd. Om de haalbaarheid van uw project en de ongeriefclassificatie te kunnen beoordelen, wordt u verzocht voor elk van de vraagstellingen te beschrijven welke secundaire paramaters bestudeerd kunnen worden, welke handelingen aan het levende dier daarvoor noodzakelijk zijn, inclusief de frequentie van de handelingen, welk percentage van de dieren naar verwachting deze handelingen zal ondergaan en in welke mate deze handelingen het cumulatief ongerief van de dieren zal beïnvloeden. U wordt ook verzocht, voor de verschillende vraagstellingen, de mogelijke 'overige' handelingen aan de dieren te beschrijven. U dient hierbij aan te geven welk percentage dieren, naar verwachting, deze handelingen zullen ondergaan en in welke mate dit het cumulatief ongerief van de individuele dieren zal beïnvloeden.

-In uw projectvoorstel geeft u aan dat, afhankelijk van de onderzoeksvraag, dieren voor verschillende perioden gevolgd zullen worden na de infectie. Om inzicht te kunnen krijgen in het cumulatieve ongerief van individuele dieren, wordt u verzocht te beschrijven op basis van welke criteria besloten zal worden hoe lang de dieren gevolgd gaan worden. Daarnaast wordt u verzocht toe te lichten of en op welke wijze dieren die langer gevolgd gaan worden andere of meer handelingen zullen ondergaan dan dieren die voor maximaal een week gevolgd zullen worden. U wordt ook verzocht aan te geven of en in welke mate een langere volgorperiode, en bijbehorende handelingen, zal leiden tot meer ongerief. Indien meer ongerief te verwachten is, wordt u verzocht aan te geven voor welk percentage van de dieren dit zal gelden.

-In de bijlage dierproeven beschrijft u een aantal verschillende methoden voor toediening van stoffen. U wordt verzocht aan te geven op basis van welke criteria voor welke toedieningsvorm, gekozen gaat worden. Het cumulatief ongerief van de individuele dieren wordt mede bepaald door de gekozen methode van toediening en de frequentie van toediening. U wordt daarom verzocht aan te geven welk percentage van de dieren, naar verwachting, welke handelingen zullen ondergaan en in welke mate dit het cumulatief ongerief van de dieren zal beïnvloeden.

Tenslotte wordt u verzocht in uw NTS het totale aantal dieren weer te geven.

Opsturen informatie

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. De CCD zou uw aanvraag graag tijdens haar eerstvolgende vergadering bespreken. De CCD zou de gevraagde informatie derhalve graag uiterlijk dinsdag 28 april 2015 van u ontvangen. U kunt deze informatie onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD504002015107) aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

Datum

23 April 2015

Onze referentie

AVD504002015107

Wanneer een beslissing

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut). De CCD zou de gevraagde informatie graag uiterlijk donderdag 02 april 2015 van u ontvangen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | | |
|----------------|--|------------|--|
| Naam aanvrager | | | |
| Postcode | | Huisnummer | |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | | | |
|----------------|--|--|--|
| Aanvraagnummer | | | |
|----------------|--|--|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| ☐ | |
| ☐ | |
| ☐ | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | | |
|--------------|---|---|----|
| Naam | | | |
| Datum | - | - | 20 |
| Handtekening | | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Hieronder vindt u in rood de antwoorden op de vragen van de CCD met referentie AVD504002015107.

-U geeft in de bijlage beschrijving dierproeven aan dat de muis over het algemeen slechts milde klinische verschijnselen, zoals pilo-erectie, benauwdheid en gewichtsverlies, vertoont en dat de infectie ook zonder klinische symptomen kan verlopen. U geeft ook aan dat klinische symptomen daarom niet geschikt zijn als primaire parameters om RSV infectie te monitoren in de muis. Om de geschiktheid van de door u gekozen diersoort, de muis, te kunnen beoordelen, wordt u verzocht toe te lichten in hoeverre de muis, gezien de beperkte klinische verschijnselen en de mate van virusreplicatie, gebruikt kan worden om het effect van specifieke medicijnen op het door RSV geïnduceerd klinisch fenotype te bestuderen.

Het effect van de medicijnen of vaccins op de klinische verschijnselen is niet het doel van de aanvraag. RSV is in staat de epitheelcellen in de longen van de muis te infecteren en daar te repliceren. De virale load piekt na 3-6 dagen na infectie en is opgeruimd na 8 dagen. Dit maakt het model geschikt om het effect van nieuwe medicijnen of vaccins op de replicatie van het virus in de longen te meten. Dit is een eerste vereiste waaraan een medicijn of vaccin moet voldoen voor verdere ontwikkeling voor toepassing in de mens.

Dit is toegevoegd in deel A van de beschrijving dierproeven.

- In de bijlage beschrijving dierproeven geeft u aan dat u mogelijk gebruik wilt maken van andere muizenstammen. U geeft echter ook aan dat RSV infectie efficiënter verloopt in BALB/C muizen dan andere muizenstammen. Om inzicht te krijgen in de geschiktheid van het door u gekozen modelsysteem en de haalbaarheid van uw project, wordt u verzocht toe te lichten op basis van welke criteria u zult besluiten gebruik te maken van een andere muizenstam. U wordt ook verzocht de bruikbaarheid van alternatieve muizenstammen toe te lichten en deze te specificeren.

Op dit moment en met de huidige kennis is de BALB/c muis het meest geschikte dier voor deze studies. Ontwikkelingen in muizenstammen gaan heel snel en binnen de termijn van deze aanvraag zou een andere stam voordelen kunnen hebben boven de BALB/c muis. Ook kan het zijn dat een opdrachtgever kennis heeft opgedaan in een voortraject in een andere muizenstam dan de BALB/c muis. Om resultaten te kunnen vergelijken en niet onnodig extra controles mee te moeten nemen, kan het dan de voorkeur hebben om door te gaan in een andere muizenstam. Mocht een van deze zaken aan de orde komen dan zullen wij onze overwegingen hierover voorleggen aan de IvD.

Dit is toegevoegd aan deel B van de beschrijving dierproeven.

-U geeft in de bijlage beschrijving dierproeven aan dat bij voorkeur gebruik wordt gemaakt van vrouwelijke muizen. Om inzicht te krijgen in de hoeveelheid in voorraad gedode dieren, wordt u verzocht aan te geven waarom geen gebruik gemaakt kan worden van mannelijke muizen en in hoeverre de mannelijke muizen in voorraad gedood zullen worden.

Verhoogde gevoeligheid in de luchtwegen na methacholinebehandeling is beschreven voor mannelijke muizen t.o.v. vrouwelijke muizen (Card et al 2006). Omdat het hier gaat om een infectie aan de luchtwegen gaat de voorkeur uit naar vrouwelijke muizen zodat er minder muizen per groep nodig zijn om de resultaten te behalen. Dit is toegevoegd aan deel B van de beschrijving dierproeven.

Wij zijn ons bewust van de keuze voor alleen vrouwelijke muizen, maar doordat met deze beperking minder dieren ongerief ondervinden weegt het ongerief dat de dieren kunnen ondervinden in deze studies in op tegen de eventuele mogelijkheid dat een deel van de muizen niet besteld wordt bij de fokker en dus ongebruikt doodgemaakt moet worden. Overigens hebben wij een dierproevenbeleid waarbij het terugdringen van in voorraad gedode dieren een belangrijk speerpunt is. Met betrekking tot dieren die wij van erkende fokkers afnemen uit zich dit in het uitvoeren audits bij deze leveranciers waarbij gevraagd wordt naar hoe zij hiermee omgaan.

-U geeft aan dat per studie tussen de 80 en 150 dieren nodig zijn. Om, in het kader van vermindering, inzicht te krijgen in de toestandkoming van dit aantal, wordt u verzocht, voor elke vraagstelling, de verschillende groepen te beschrijven.

De verschillende groepen die worden opgenomen zijn afhankelijk van aantal te testen nieuwe medicijnen en/of de hoeveelheid doses die worden getest. Daar waar mogelijk zullen controlegroepen worden gecombineerd binnen een studie om het totaal aantal dieren te verminderen. Bovendien is het soms mogelijk om de proefopzet zo te kiezen dat gewerkt wordt met ongelijke groepsgrootte. Hierdoor wordt de power verhoogd terwijl het totaal aantal dieren verlaagd kan worden.

In het validatie-experiment zullen 5 dieren per groep worden gebruikt. Hieronder volgt een voorbeeld.

Groep	N	RSV	euthanaseren
1	5	Dag 0	Day 1
2	5	Dag 0	Day 2
3	5	Dag 0	Day 3
4	5	Dag 0	Day 4
5	5	Dag 0	Day 5
6	5	Dag 0	Day 6
7	5	Dag 0	Day 7
8	5	Dag 0	Day 8

Totaal 40 dieren

Afhankelijk van de spreiding van de virale load tussen muizen zullen naar verwachting 5-10 dieren per groep worden gebruikt in experimentele studies. Dit zal, zoals in de beschrijving dierproeven aangegeven, worden bepaald aan de hand van de uitkomst van de validatiestudie.

De uiteindelijke samenstelling van de studie zal worden beschreven in het studieplan dat ter beoordeling wordt voorgelegd aan de IvD. Ter voorbeeld volgen hieronder 2 verschillende opzetten. Hieronder is een voorbeeld weergegeven waarin een aantal nieuwe medicijnen wordt getest in 2 verschillende doses. Het doel daarvan zou kunnen zijn om een idee van de werkzaamheid van de stof te krijgen alvorens men overgaat tot een uitgebreider testen van doseringen of combinatietherapie, bijvoorbeeld.

Groep	N	Behandeling	Toediening	RSV	euthanaseren
1	10	Vehicle	p.o. dag 1,2	Dag 0	Day 5
2	10	Vehicle	i.p. dag 1,2	Dag 0	Day 5

3	10	Positieve controle	p.o. dag 1,2	Dag 0	Day 5
4-5	7	Antiviral 1 2 doses	p.o. dag 1,2	Dag 0	Day 5
6-7	7	Antiviral 2 2 doses	p.o. dag 1,2	Dag 0	Day 5
8-9	7	Antiviral 3 2 doses	p.o. dag 1,2	Dag 0	Day 5
10-11	7	Antiviral 4 2 doses	p.o. dag 1,2	Dag 0	Day 5
12-13	7	Antiviral 5 2 doses	i.p. dag 1,2	Dag 0	Day 5
14-15	7	Antiviral 6 2 doses	i.p. dag 1,2	Dag 0	Day 5

Totaal ongeveer 114 dieren.

Het tweede overzicht beschrijft een voorbeeldstudie met enkele antivirale middelen in meerdere verschillende doses, waarbij ook bloed afgenomen kan worden.

Groep	N	Behandeling	Toediening	RSV	Bloedafname	euthanaseren
1	10-15	Vehicle	p.o. dag 1,2,3	Dag 0	1h na 1e dosis, 0.5h voor 2e dosis, 1h na laatste dosis en bij euthanaseren	Day 4
2	5	Positieve controle	p.o. dag 1,2,3	Dag 0	1h na 1e dosis, 0.5h voor 2e dosis, 1h na laatste dosis en bij euthanaseren	Day 4
3-7	5-7	Antiviral 1 5 doses	p.o. dag 1,2,3	Dag 0	1h na 1e dosis, 0.5h voor 2e dosis, 1h na laatste dosis en bij euthanaseren	Day 4
8-12	5-7	Antiviral 2 5 doses	p.o. dag 1,2,3	Dag 0	1h na 1e dosis, 0.5h voor 2e dosis, 1h na laatste dosis en bij euthanaseren	Day 4

Totaal ongeveer 90 dieren

Deze uitleg met voorbeelden is toegevoegd in deel A van de beschrijving dierproeven.

-U geeft aan dat u verschillende RSV varianten wilt gaan gebruiken die elk een ander klinisch fenotype induceren. Om de haalbaarheid van uw project en het cumulatieve ongerief van de dieren te kunnen beoordelen, wordt u verzocht aan te geven voor welk doel u welke variant wilt gaan gebruiken. U wordt tevens verzocht aan te geven, op basis van de literatuur, welke klinische fenotypes de te testen varianten hebben en in hoeverre deze verschillende fenotypes zullen leiden tot meer of minder ongerief bij de dieren.

Er zijn een aantal bestaande modellen met verschillende RSV varianten, o.a. RSV-A2, RSV line19, RSV Long (Moore et al 2009) en andere klinische RSV varianten (Woolums et al 2011, Stokes et al 2011). De verschillen tussen de varianten uiteten zich in bijvoorbeeld de virale load in de longen,

slijmproductie, cytokineproductie, gewichtsverlies. De verschillende varianten geven voor zover bekend geen ernstige klinische verschijnselen (Moore et al 2009). De RSV variant die zal worden gebruikt, wordt gekozen op basis van het doel van de studie. RSV-A2 is belangrijk in het veld als referentie-variant. Wanneer een medicijn een effect heeft op de cytokine- of slijmproductie na infectie kan ervoor worden gekozen om gebruik te maken van RSV line19 of Long varianten aangezien deze varianten hogere cytokine- en slijmproductie geven dan RSV-A2. Wanneer de vraag is of nieuwe medicijnen of vaccins een effect hebben op bijvoorbeeld recent geïsoleerde varianten of andere klinische isolaten kan de keuze vallen op klinische isolaten. Dit is aangepast in deel 3.4.1 van de projectaanvraag. Het totale ongerief voor de dieren en de bijbehorende humane eindpunten zullen niet veranderen door de verschillende varianten.

-U geeft, in de bijlage beschrijving dierproeven, aan dat u, afhankelijk van de vraagstelling, verschillende secundaire parameters wilt bestuderen. Ook geeft u aan dat er, indien noodzakelijk, 'overige' handelingen zullen worden uitgevoerd. Om de haalbaarheid van uw project en de ongeriefclassificatie te kunnen beoordelen, wordt u verzocht voor elk van de vraagstellingen te beschrijven welke secundaire parameters bestudeerd kunnen worden, welke handelingen aan het levende dier daarvoor noodzakelijk zijn, inclusief de frequentie van de handelingen, welk percentage van de dieren naar verwachting deze handelingen zal ondergaan en in welke mate deze handelingen het cumulatief ongerief van de dieren zal beïnvloeden. U wordt ook verzocht, voor de verschillende vraagstellingen, de mogelijke 'overige' handelingen aan de dieren te beschrijven. U dient hierbij aan te geven welk percentage dieren, naar verwachting, deze handelingen zullen ondergaan en in welke mate dit het cumulatief ongerief van de individuele dieren zal beïnvloeden.

Secundaire parameters waaraan is gedacht is het meten van bijvoorbeeld de longfunctie, dit gebeurt op een non-invasieve wijze. Voor deze meting zullen ongeveer 50% van de dieren gedurende 15 minuten per dag in een plethysmograaf worden geplaatst. Het ongerief van het meten van de longfunctie wordt ingeschat op licht en verhoogt daarmee niet het totale ongerief.

Andere secundaire parameters waaraan is gedacht zullen worden geanalyseerd na euthanaseren van de muizen zoals longpathologie, slijmproductie, cytokineproductie.

Dit is toegevoegd aan deel A van de beschrijving dierproeven.

-In uw projectvoorstel geeft u aan dat, afhankelijk van de onderzoeksvraag, dieren voor verschillende perioden gevolgd zullen worden na de infectie. Om inzicht te kunnen krijgen in het cumulatieve ongerief van individuele dieren, wordt u verzocht te beschrijven op basis van welke criteria besloten zal worden hoe lang de dieren gevolgd gaan worden. Daarnaast wordt u verzocht toe te lichten of en op welke wijze dieren die langer gevolgd gaan worden andere of meer handelingen zullen ondergaan dan dieren die voor maximaal een week gevolgd zullen worden. U wordt ook verzocht aan te geven of en in welke mate een langere volgperiode, en bijbehorende handelingen, zal leiden tot meer ongerief. Indien meer ongerief te verwachten is, wordt u verzocht aan te geven voor welk percentage van de dieren dit zal gelden.

De keuze voor de periode waarin de dieren gevolgd gaan worden, wordt gebaseerd op de onderzoeksvraag. Dit kan bijvoorbeeld afhankelijk zijn van het aangrijpingsmechanisme van de nieuwe medicijnen (het voorkomen van infectie van de cel, remmen van de replicatie in de cel of uitscheiding van virusdeeltjes uit de cel). Wanneer de opdrachtgever geïnteresseerd is in bijvoorbeeld het effect op de geïnduceerde immuunrespons of het herstel van de longen na infectie

kan het wenselijk zijn om de dieren over een langere periode te volgen. Het herstel van de longen na infectie en de piek van de immuunrespons duren langer dan de piek van de virale load. Naar verwachting zullen de dieren in die periode geen extra handelingen ondergaan en daarmee zal het totale ongerief niet wijzigen.

Dit is aangepast in deel A van de beschrijving dierproeven.

-In de bijlage dierproeven beschrijft u een aantal verschillende methoden voor toediening van stoffen. U wordt verzocht aan te geven op basis van welke criteria voor welke toedieningsvorm, gekozen gaat worden. Het cumulatief ongerief van de individuele dieren wordt mede bepaald door de gekozen methode van toediening en de frequentie van toediening. U wordt daarom verzocht aan te geven welk percentage van de dieren, naar verwachting, welke handelingen zullen ondergaan en in welke mate dit het cumulatief ongerief van de dieren zal beïnvloeden.

De toedieningsvorm wordt bepaald door de te testen medicijnen of vaccins. Vaccins zullen veelal intramusculair worden toegediend, in de regel 1 tot 3 maal. Medicijnen kunnen bijvoorbeeld oraal, intraveneus, intratracheaal, intranasaal, sublinguaal of intraperitoneaal worden toegediend. De keuze van een van deze toedieningsroutes en de frequentie is afhankelijk van de samenstelling en daarbij behorende PK/PD van de medicijnen omdat niet alle stoffen geschikt zijn voor bepaalde toedieningsroutes. De medicijnen zullen niet langer worden toegediend dan tot maximaal 8 dagen na infectie. De samenstelling van medicijnen zal ook bepalen wat de frequentie van toediening is, wanneer medicijnen gedurende slechts een korte periode in het lichaam beschikbaar zijn, zullen deze ook vaker worden toegediend (bijvoorbeeld 3 opeenvolgende dagen 1x per dag,). Dit is aangepast in deel A van de beschrijving dierproeven. De toedieningsroute en frequentie zullen geen effect hebben op het totale ongerief.

Tenslotte wordt u verzocht in uw NTS het totale aantal dieren weer te geven.

De NTS is aangepast.



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50400
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO Triskelion
1.3	Vul de titel van het project in.	Dierstudies in het kader van ontwikkeling van medicijnen voor het behandelen en voorkomen van virale infecties aan de luchtwegen, in het bijzonder respiratoir syncytieel virus.

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Verkoudheid is een infectie van de bovenste luchtwegen (neusholte, neusbijholten, keel en strottenhoofd) en is de meest voorkomende infectieziekte bij mensen. Er zijn verschillende soorten virussen die een verkoudheid kunnen veroorzaken, waaronder rhinovirussen (30-80%), coronavirussen (10-15%), respiratoire syncytiele virussen, adenovirussen, para-influenzavirussen, enterovirussen. Het immuunsysteem is in staat de virusinfectie op te ruimen en veroorzaakt de symptomen van verkoudheid. Tegen verkoudheid is geen medicijn beschikbaar. Na een infectie ontstaat meestal een jarenlange immuniteit voor het specifieke virus. Omdat er zoveel verschillende virussen een verkoudheid kunnen veroorzaken, worden volwassenen gemiddeld 2-5 keer per jaar verkouden, kinderen zelfs 6-12 keer per jaar. Een verkoudheid is meestal niet ernstig. Bij ouderen, jonge kinderen en mensen met een verzwakt immuunsysteem kunnen echter ernstige complicaties optreden; bijkomende bacteriële infecties kunnen zich voordoen en leiden tot keel- of bijholteontsteking of een oorinfectie.

Dit projectvoorstel betreft onderzoek naar medicijnen en vaccins tegen respiratoir syncytieel virus (RSV). Van de genoemde verkoudheidsvirussen is dit de meest voorkomende omdat, in tegenstelling tot de meeste virussen, immuniteit tegen RSV niet levenslang is en dus gedurende het leven verschillende ziekte-episoden door RSV kunnen ontstaan. In zeer jonge kinderen kan besmetting met RSV leiden tot een infectie van de lagere luchtwegen (zoals de longen). RSV infectie kan in risicogroepen (premature baby's, kinderen jonger dan 2 jaar met een chronische longaandoening of hartproblemen, volwassenen ouder dan 65 en mensen met een verzwakt immuunsysteem door bijvoorbeeld een HIV-infectie, orgaantransplantatie of chemotherapie) een ernstig tot zeer ernstig verloop hebben waarbij ziekenhuisopname noodzakelijk is. RSV infecteert de epitheelcellen van de luchtwegen en het immuunsysteem is in staat het virus op te ruimen. Omdat geen levenslange immuniteit wordt opgebouwd, kunnen mensen dus meerdere keren geïnfecteerd raken met RSV. Buiten de medicijnen Ribavirin® en Synagis®, is geen vaccin tegen RSV beschikbaar. Het antivirale middel Ribavirin® blijkt in de praktijk slechts beperkt werkzaam. Voor risicogroepen (leeftijd jonger dan 2 jaar) is een preventief medicijn beschikbaar, namelijk Synagis®. Dit medicijn wordt gedurende het RSV seizoen maandelijks toegediend. Synagis® wordt alleen toegediend aan risicogroepen ter voorkoming van resistentie van RSV tegen Synagis® en vanwege de hoge kosten van de behandeling. De farmaceutische industrie richt zich op het ontwikkelen van nieuwe medicijnen om ernstige RSV infectie te kunnen behandelen

en om de potentiële langetermijneffecten (terugkerende piepende ademhaling of astma) veroorzaakt door RSV te reduceren. Daarnaast is er behoefte aan de ontwikkeling van een vaccin dat levenslange bescherming biedt.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

De farmaceutische industrie ontwikkelt medicijnen om ernstige infectie met RSV te behandelen, alsook medicijnen en vaccins die langdurige bescherming bieden tegen RSV infectie. In de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en vaccins zijn twee fasen te onderscheiden: Research & Development (R&D) en de preklinische fase. In de R&D fase worden nieuwe medicijnen/vaccins gekarakteriseerd en gescreend in diverse *ex vivo* en *in vitro* assays (zoals bijvoorbeeld binding assays en neutralisatie assays). Nieuwe medicijnen/vaccins die in deze fase effectiviteit laten zien, worden in de preklinische fase getest. Het preklinische onderzoek richt zich op de toedieningsroute, dosering, frequentie, (immunologisch) werkingsmechanisme, mogelijke bijwerkingen en de mogelijkheid tot combinatie van het nieuwe medicijn met andere therapieën (zogenaamde combinatietherapie). De resultaten van het preklinisch onderzoek worden gebruikt voor het registratiedossier dat voor toelating op de markt aan de registratieautoriteiten moet worden overlegd. Preklinisch onderzoek is o.a. gebaseerd op dierexperimenteel onderzoek. In dit project zullen kandidaten voor de behandeling van RSV in de preklinische fase worden geëvalueerd in een RSV muismodel. Hiertoe zal een gevalideerd muismodel worden ontwikkeld binnen onze instelling, waarna vaccins (profylactisch) en antivirale middelen en/of immunomodulators (therapeutisch) kunnen worden getest voor hun effectiviteit op het remmen van RSV infectie.

3.3 Belang

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

RSV infectie is een veelvoorkomende oorzaak van verkoudheid. In jonge kinderen kan RSV infectie snel overslaan naar de lagere luchtwegen en resulteren in een ernstiger verloop. Hoewel RSV infectie zelden leidt tot mortaliteit, kan een infectie in zeer jonge baby's ernstig verlopen. Volgens de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) heeft 25-40% van de voor het eerst geïnfecteerde kinderen symptomen van een bronchiolitis of een pneumonie. En voor 0.5-2% van de patiënten is ziekenhuisopname noodzakelijk (bron: Wereldgezondheidsorganisatie; WHO). Virale bronchiolitis is geassocieerd met terugkerende piepende ademhaling of astma. Het antivirale middel Ribavirin® is slechts beperkt werkzaam en preventieve behandeling met Synagis® wordt alleen gegeven aan kinderen uit risicogroepen. Synagis® moet herhaaldelijk worden toegediend tijdens het RSV seizoen en daardoor bestaat het risico dat resistentie optreedt. Daarnaast brengt dit hoge medische kosten met zich mee. Daarom wordt onderzoek gedaan naar een vaccin dat na eenmalige toediening levenslang beschermt, zonder dat resistentie optreedt. Daarnaast zoekt men ook naar een medicijn voor de therapeutische behandeling na infectie met RSV. Onderzoek naar nieuwe antivirale middelen, immuunmodulators en vaccins is dan ook noodzakelijk. Daarnaast is er ook een economisch belang: het beheersen van kosten van de gezondheidszorg. Bovendien worden de economische gevolgen van verkoudheid vaak onderschat: de kosten van voorgeschreven medicijnen, ziekmelding door mensen die verkouden zijn, ouders die niet kunnen werken omdat de kinderen ziek zijn etc.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Voor het testen van nieuwe therapieën tegen RSV maken we gebruik van een diermodel. Nieuwe medicijnen of vaccins zullen altijd in meerdere diermodellen worden getest alvorens ze worden getest in mensen. Wij maken gebruik van het muismodel. Diernodellen vormen een cruciale link tussen de

mechanistische studies *in vitro* en klinische studies in mensen. De beschikbare diersmodellen voor RSV zijn de muis, katoenrat en het schaap (Bem et al 2011, Woolums et al 2011). De katoenrat is een diersmodel die een hoge translatie heeft naar de mens. De katoenrat is daarentegen moeilijk om te hanteren en huisvesten, dieren dienen individueel te worden gehuisvest en het ongerief is daarmee ook hoger (Niewiesk et al 2002). Dit maakt het lastig om meerdere condities (zoals verschillende medicijnen, doses of toedieningsroutes) te testen in één experiment. Muizen zijn daarentegen makkelijk te hanteren en huisvesten. Daarnaast is er een breed scala aan immunologische en moleculaire reagentia beschikbaar voor de muis. Het muismodel geeft de mogelijkheid verschillende condities (zoals doseringen en toedieningsroutes) te testen in één experiment en het werkingsmechanisme in detail te kunnen onderzoeken. Dit model is daarmee zeer geschikt als een screeningsmodel, waaruit geschikte kandidaten worden geselecteerd die verder worden ontwikkeld (en getest in diersmodellen met een hogere transleerbaarheid, waaronder de katoenrat) voordat ze worden toegepast in de mens.

Het RSV muismodel zal eerst bij ons in-huis moeten worden gevalideerd. **Er zijn een aantal bestaande modellen met verschillende RSV varianten, o.a. RSV-A2, RSV line19, RSV Long (Moore et al 2009) en andere klinische RSV varianten (Woolums et al 2011, Stokes et al 2011).** De verschillen tussen de varianten uiten zich in bijvoorbeeld de virale load in de longen, slijmproductie, cytokineproductie, gewichtsverlies. De verschillende varianten geven voor zover bekend geen ernstige klinische verschijnselen (Moore et al 2009). De RSV variant die zal worden gebruikt, wordt gekozen op basis van het doel van de studie. RSV-A2 is belangrijk in het veld als referentie-variant. Wanneer een medicijn een effect heeft op de cytokine- of slijmproductie na infectie kan ervoor worden gekozen om gebruik te maken van RSV line19 of Long varianten aangezien deze varianten hogere cytokine- en slijmproductie geven dan RSV-A2. Wanneer de vraag is of nieuwe medicijnen of vaccins een effect hebben op bijvoorbeeld recent geïsoleerde varianten of andere klinische isolaten kan de keuze vallen op klinische isolaten. De beoogde vraagstelling van de opdrachtgever bepaalt de keuze voor de te gebruiken RSV variant. Deze vraagstelling en keuze voor een specifiek RSV model zullen worden onderbouwd in het studieplan.

Het muismodel in onze instelling zal worden gebaseerd op reeds bestaande modellen beschreven in de literatuur en zal worden gevalideerd d.m.v. kinetiek analyse van de virale infectie. Voor het bepalen van de effectiviteit van een nieuw medicijn/vaccin in vervolgstudies wordt het aantal virale deeltjes (virale load) in de longen bepaald op een bepaalde dag na infectie, afhankelijk van de kinetiek van de RSV infectie en het werkingsmechanisme van het medicijn/vaccin. RSV infecteert en repliceert in het longweefsel. De virale load in de longen piekt tussen dag 3 en 6 na infectie en is binnen circa 8 dagen opgeruimd. Het bepalen van de virale load stelt ons in staat de effectiviteit van medicijnen op de ernst van de RSV infectie te bepalen. RSV infectie van muizen kan ook effect hebben op lichaamsgewicht, klinische verschijnselen en longfunctie, en deze dienen als secundaire uitleesparameter in het diersmodel. Bij de validatie van het model zal worden bepaald wanneer de piek in de virale load is en zal het ziekteverloop in de muizen in kaart worden gebracht. Aan de hand van het ziekteverloop zullen humane eindpunten worden bepaald, hierbij wordt gedacht aan pompemde ademhaling, blauwkleuring van de slijmvliezen, gewichtsverlies van meer dan 20%.

Aansluitend zullen RSV modellen worden gebruikt voor het testen van de effectiviteit van nieuwe antivirale middelen en/of vaccins door muizen te behandelen met de nieuwe therapieën voor- of nadat ze zijn geïnfecteerd met RSV. Afhankelijk van de specifieke RSV variant die wordt gebruikt voor de infectie kan op verschillende manieren de progressie van RSV infectie worden gevolgd. De uitleesparameters zijn onder andere, maar niet beperkt tot, virale load in de longen, gewicht, klinische verschijnselen, longfunctie, slijmproductie, longpathologie en immunologische uitleesparameters. RSV infectie in muizen is een niet-lethale infectie. Afhankelijk van de onderzoeksvraag zullen de dieren worden gevolgd gedurende ongeveer een week, eventueel langer indien het herstel van infectie of het effect op de longen na langere tijd wordt bestudeerd.

Het studie design van iedere individuele studie zal conform de code of good practice (van Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001); A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes) worden uitgevoerd.

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

1) Validatie van RSV muismodellen

Als eerste zal het RSV muismodel worden opgezet en gevalideerd. Hiertoe zullen dieren intranasaal worden geïnfecteerd (challenge) met één of meerdere doses van een bepaalde RSV variant. Bij de validatie van het model zal elke dag een groep dieren worden geëuthanaseerd en de virale load in de longen

worden bepaald om de kinetiek van de infectie in kaart te brengen. De virale load in de longen is de maat voor de ernst van de RSV infectie en dus de primaire uitleesparameter om remming door therapie te evalueren. Uit de literatuur is bekend dat de piek van de virale load ligt tussen dag 3 en dag 6 post-challenge. Het validatie experiment zal uitwijzen wanneer de longen moeten worden geanalyseerd in toekomstige RSV studies. Daarnaast zal ook het ziekteverloop in de dieren in kaart worden gebracht op basis van klinische verschijnselen, zodat humane eindpunten kunnen worden bepaald (mogelijke pompemde ademhaling, blauwkleuring van slijmvlies door benauwdheid, >20% gewichtsverlies). Hierna kan het model worden gebruikt voor het testen van nieuwe medicijnen/vaccins tegen RSV.

2) Testen van medicijnen (zowel therapeutisch als profylactisch) in het RSV muismodel, zoals

- Monoklonale antilichamen

De studies die onder dit onderzoeksvoorstel vallen, zijn erop gericht om breed beschermende antilichamen te onderzoeken op profylactische of therapeutische effectiviteit in virus challenge modellen.

- Kleine eiwitten

In dit onderzoeksvoorstel worden medicijnen ontwikkeld die uiteindelijk "needle free" zullen worden toegediend.

- Small molecules

Een andere benadering is het ontwikkelen van kleine moleculen (small molecules) met als doel om een medicijn tegen RSV te ontwikkelen dat oraal kan worden toegediend.

3) Testen van vaccins in het RSV muismodel (profylactisch)

Er worden diverse vaccinmodellen voor RSV onderzocht, zoals bijvoorbeeld een verzwakt virus, virosomes of een vaccin gericht tegen de structurele eiwitten van RSV, zoals het F-, G-, N-, of M2-eiwit. Verschillende strategieën worden gebruikt om deze eiwitten na te bouwen. Vaccinvarianten die *in vitro* succesvolle binding aan RSV laten zien of remming van RSV infectie in celweek systemen, worden vervolgens getest voor effectiviteit *in vivo*, gevolgd door beoordeling van de door het vaccin opgewekte immuunrespons. Een manier om het vaccin te verbeteren is het toevoegen van een adjuvans. Adjuvantia kunnen een significante verbetering van de immunogeniciteit van vaccins laten zien, door zowel de humorale als de cellulaire immuunrespons na immunisatie te verbeteren. Het doel is hierbij vaak om superioriteit aan te tonen ten opzichte van huidige adjuvantia (b.v. alumen-gebaseerd). In klinische onderzoeken is de veiligheid van b.v. saponine houdende vaccins aangetoond en is de immuunrespons na vaccinatie verbeterd.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Voordat een van bovenstaande nieuwe therapieën kan worden getest zal eerst het te gebruiken RSV diemodel in de muis worden gevalideerd. Bij het opzetten van het model met de betreffende RSV variant wordt het verloop van de virale load in de longen en het ziekteverloop van de dieren in kaart gebracht. Op basis hiervan wordt in vervollexperimenten de dag voor isolatie van de longen bepaald en kunnen tevens humane eindpunten in kaart worden gebracht. Na het opzetten van een gevalideerd diemodel, zullen nieuwe medicijnen/vaccins worden getest, na profylactische en/of therapeutische toediening. De antivirale middelen of vaccins die RSV infectie remmen in het muismodel, zijn veelbelovende kandidaten voor verdere ontwikkeling en zullen ook in andere diere modellen (waaronder de katoenrat) worden getest.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Respiratoir syncytieel virus (RSV) infectiemodel in muizen
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50400	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	TNO Triskelion	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3.4.4.1	Respiratoir syncytieel virus (RSV) infectiemodel in muizen

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor het testen van de effectiviteit van nieuwe antivirale middelen en vaccins zal gebruik worden gemaakt van een RSV muismodel. Het muismodel is een veelvuldig gebruikt model voor onderzoek naar RSV. De voordelen van muizen t.o.v. andere RSV diersystemen als katoenrat en schaap zijn de beschikbaarheid van reagentia voor de muis, verkrijgbaarheid en huisvesting van muizen (Bem et al 2011, Woolums et al 2011). Ondanks dat het een heteroloog model is, omdat de muis geen natuurlijke gastheer is voor humaan RSV, is RSV wel in staat de epitheelcellen in de longen te infecteren en daar te repliceren. Het aantal virale deeltjes (i.e. virale load) in de longen piekt tussen dag 3 en 6 en is na circa 8 dagen opgeruimd. **Dit maakt het model geschikt om het effect van nieuwe medicijnen of vaccins op de replicatie van het virus in de longen te meten. Dit is een eerste vereiste waaraan een medicijn of vaccin**

moet voldoen voor verdere ontwikkeling voor toepassing in de mens. Het herstel van het longweefsel zelf duurt echter langer en kan tot 14 dagen na initiële infectie duren (Mejías et al 2004). De muis vertoont over het algemeen milde klinische verschijnselen, zoals pilo-erectie, benauwdheid en gewichtsverlies, maar de infectie kan ook zonder klinische symptomen verlopen. Daarom zijn klinische symptomen niet geschikt als primaire parameter om RSV infectie te monitoren, maar de gezondheid van de muizen zal wel nauwkeurig worden gevolgd. Virale load in de longen is de primaire uitkomstparameter voor het bepalen van de effectiviteit van nieuwe medicijnen en vaccins gericht tegen RSV. Deze nieuwe medicijnen/vaccins kunnen de virusreproductie in de longen (direct of indirect) remmen. Afhankelijk van de te gebruiken RSV variant en de vraagstelling kunnen secundaire uitkomstparameters worden geanalyseerd zoals, maar niet beperkt tot, longfunctie, slijmproductie en longpathologie. Wanneer longfunctie wordt gemeten zal dat dagelijks worden gedaan in ongeveer 50% van de dieren op een non-invasieve manier m.b.v. een plethysmograaf waar de dieren gedurende 15 minuten in zullen zitten. Het ongerief van het meten van de longfunctie wordt ingeschat op licht. Slijmproductie en longpathologie zal worden geanalyseerd in de longen nadat de dieren zijn geëuthanaseerd.

Voordat nieuwe medicijnen of vaccins kunnen worden getest zal eerst het RSV muismodel (zoals beschreven in de literatuur) binnen onze instelling worden gevalideerd. Na het valideren van het muismodel, kan dit model gebruikt worden voor het testen van nieuwe medicijnen/vaccins. Voor het opzetten van het RSV muismodel zullen muizen intranasaal worden geïnfecteerd met RSV. Er is voor intranasale toediening gekozen omdat dit de natuurlijke route van infectie is bij de mens. De RSV infectie in muizen is een niet-lethaal model met over het algemeen milde klinische verschijnselen. De primaire uitleesparameter is de virale load in de longen. Daarnaast zullen de muizen dagelijks worden gewogen en worden geobserveerd voor het optreden van klinische verschijnselen. Bij de validatie van het muismodel zullen muizen intranasaal worden geïnfecteerd met RSV waarna op aangegeven dagen een groep muizen wordt geëuthanaseerd en de virale load in de longen wordt bepaald. Dit zal bepalen wat de kinetiek is van de virale load na infectie. Deze validatiestudie zal ook worden gebruikt voor het uitvoeren van een statistische power-analyse voor opvolgende studies. Wanneer het model is gevalideerd kunnen nieuwe medicijnen/vaccins worden getest in het muismodel. Daartoe zullen muizen worden behandeld met één of meerdere doses van nieuwe medicijnen/vaccins. Tevens zal altijd een negatieve en positieve controlegroep (Synagis® of een andere werkzame stof) worden meegenomen. Muizen zullen een RSV infectie (challenge) krijgen op dag 0. Behandeling kan plaatsvinden op een of meerdere dagen voor- of nadat de dieren een RSV challenge krijgen. Dit wordt nader gespecificeerd in het studieplan. De dieren worden gevolgd voor een periode van 8 dagen, tenzij anders aangegeven in het studieplan. De keuze voor de periode waarin de dieren gevolgd gaan worden, wordt gebaseerd op de onderzoeksvraag. Dit kan bijvoorbeeld afhankelijk zijn van het aangrijpingsmechanisme van de nieuwe medicijnen (het voorkomen van infectie van de cel, remmen van de replicatie in de cel of uitscheiding van virusdeeltjes uit de cel). Wanneer de opdrachtgever geïnteresseerd is in bijvoorbeeld het effect op de geïnduceerde immuunrespons of het herstel van de longen na infectie kan het wenselijk zijn om de dieren over een langere periode te volgen. Het herstel van de longen na infectie en de piek van de immuunrespons duren langer dan de piek van de virale load. Naar verwachting zullen de dieren in die periode geen extra handelingen ondergaan. In het studieplan zal worden gespecificeerd welke medicijnen/vaccins en welke doseringen de muizen krijgen toegediend, hoe lang de studie duurt en of naast virale load ook secundaire uitleesparameters worden gebruikt.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

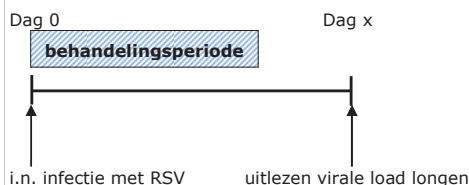
In een validatiestudie zal een grote groep muizen op dag 0 intranasaal worden geïnfecteerd met een bepaalde RSV variant. Klinische verschijnselen en lichaamsgewicht worden gevolgd om ziekte door RSV in kaart te brengen en de humane eindpunten te bepalen. Op basis van literatuur is bekend dat virale load in de longen tussen dag 3 en 6 na infectie maximaal is, waarna het virus wordt opgeruimd. Om te bepalen wat de kinetiek van RSV infectie in het te valideren model is, zullen op elke dag 5 geïnfecteerde muizen worden geëuthanaseerd om de virale load in de longen te bepalen. De uitkomsten van deze validatiestudie zullen worden gebruikt om te bepalen op welke dag/dagen de virale load in vervolgstudies gemeten moet worden om de effectiviteit van medicatie te kunnen waarnemen. Door 5 muizen per tijdstip te gebruiken, kan spreiding tussen de muizen op een betrouwbare manier in kaart worden

gebracht. De resultaten van de validatiestudie worden vervolgens gebruikt voor de statistische power-analyse voor volgende studies.

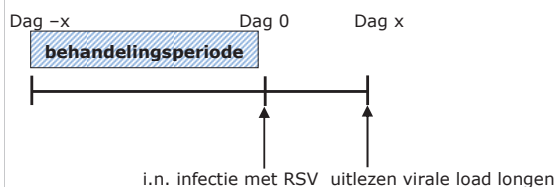
De primaire uitleesparameter voor het testen van effectiviteit van nieuwe medicijnen/vaccins tegen RSV is de virale load in de longen. Daarnaast zullen ook klinische verschijnselen en lichaamsgewicht worden geanalyseerd. Afhankelijk van de vraagstelling in de studie zal een behandelingsstrategie met de (nieuwe) medicijnen worden opgesteld (door experts binnen het projectteam) en dit kan per studie variëren. Mogelijke variaties zijn: tijdstip van toediening, bijvoorbeeld profylactisch of therapeutisch (of een combinatie hiervan), éénmalig versus herhaalde toediening (met verschillen in tijdsduur van de intervallen tussen de toedieningen), toediening van combinaties van medicijnen, route van toediening (waaronder oraal, intranasaal, intramusculair, intratracheaal, intraveneus, intradermaal, subcutaan en sublinguaal, conform de code of good practice (van Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001))). De toedieningsvorm wordt bepaald door de te testen medicijnen of vaccins. Vaccins zullen veelal intramusculair worden toegediend, in de regel 1 tot 3 maal. Medicijnen kunnen bijvoorbeeld oraal, intraveneus, intratracheaal, intranasaal, sublinguaal of intraperitoneaal worden toegediend. De keuze van een van deze toedieningsroutes en de frequentie is afhankelijk van de samenstelling en daarbij behorende PK/PD van de medicijnen omdat niet alle stoffen geschikt zijn voor bepaalde toedieningsroutes. De medicijnen zullen niet langer worden toegediend dan tot maximaal 8 dagen na infectie. De samenstelling van medicijnen zal ook bepalen wat de frequentie van toediening is, wanneer medicijnen gedurende slechts een korte periode in het lichaam beschikbaar zijn, zullen deze ook vaker worden toegediend (bijvoorbeeld 3 opeenvolgende dagen 1x per dag,). Het finale studie design wordt door het project team (bestaande uit interne en externe experts) bepaald en (statistisch) onderbouwd en deze informatie dient als basis voor het studieplan van elke studie. Het studieplan zal verder alle details beschrijven die nodig zijn voor een goede ethische beoordeling, zoals doel van de proef, wetenschappelijke achtergrond, onderbouwing van de groepsgrootte, de RSV stam, beschrijving (statistische) analyse van studie data etc.

De proefopzet wordt bepaald door het te testen medicijn of vaccin. Wanneer medicijnen voor therapeutische behandeling worden getest, zal de behandeling plaatsvinden in de periode nadat de dieren zijn geïnfecteerd met RSV. Wanneer een profylactische behandeling met een vaccin of medicijn wordt uitgevoerd, zal de behandeling altijd plaatsvinden voordat de dieren worden geïnfecteerd met RSV. De positieve controle groep zal worden behandeld met een bestaand medicijn b.v. Synagis® of een andere stof met een bekende positieve werking. Als negatieve controle zullen muizen worden behandeld met de vehicle (drager) van de te testen medicijnen/vaccins. Omdat alle groepen worden vergeleken met de negatieve controlegroep zal de grootte van deze groep zo worden gekozen dat voldoende power wordt verkregen wanneer deze groep meerdere keren wordt gebruikt in de statistische analyse. Een schematische weergave van therapeutische en profylactische behandeling is hieronder aangegeven (N.B. het uiteindelijke design zal worden gespecificeerd in het studieplan).

Studie met therapeutische behandeling:



Studie met profylactische behandeling:



De verschillende groepen die worden opgenomen zijn afhankelijk van aantal te testen nieuwe medicijnen en/of de hoeveelheid doses die worden getest. Daar waar mogelijk zullen controlegroepen worden gecombineerd binnen een studie om het totaal aantal dieren te verminderen. Bovendien is het soms mogelijk om de proefopzet zo te kiezen dat gewerkt wordt met ongelijke groepsgrootte. Hierdoor wordt de power verhoogd terwijl het totaal aantal dieren verlaagd kan worden.

In het validatie-experiment zullen 5 dieren per groep worden gebruikt. Hieronder volgt een voorbeeld.

Groep	N	RSV	euthanaseren
1	5	Dag 0	Day 1
2	5	Dag 0	Day 2
3	5	Dag 0	Day 3
4	5	Dag 0	Day 4
5	5	Dag 0	Day 5
6	5	Dag 0	Day 6
7	5	Dag 0	Day 7
8	5	Dag 0	Day 8

Totaal 40 dieren

Afhankelijk van de spreiding van de virale load tussen muizen zullen naar verwachting 5-10 dieren per groep worden gebruikt in experimentele studies. Dit zal, zoals in de beschrijving dierproeven aangegeven, worden bepaald aan de hand van de uitkomst van de validatiestudie.

De uiteindelijke samenstelling van de studie zal worden beschreven in het studieplan dat ter beoordeling wordt voorgelegd aan de IvD. Ter voorbeeld volgen hieronder 2 verschillende opzetten. Hieronder is een voorbeeld weergegeven waarin een aantal nieuwe medicijnen wordt getest in 2 verschillende doses. Het doel daarvan zou kunnen zijn om een idee van de werkzaamheid van de stof te krijgen alvorens men overgaat tot een uitgebreider testen van doseringen of combinatietherapie, bijvoorbeeld.

Groep	N	Behandeling	Toediening	RSV	euthanaseren
1	10	Vehicle	p.o.	Dag 0	Day 5

			dag 1,2		
2	10	Vehicle	i.p. dag 1,2	Dag 0	Day 5
3	10	Positieve controle	p.o. dag 1,2	Dag 0	Day 5
4-5	7	Antiviral 1 2 doses	p.o. dag 1,2	Dag 0	Day 5
6-7	7	Antiviral 2 2 doses	p.o. dag 1,2	Dag 0	Day 5
8-9	7	Antiviral 3 2 doses	p.o. dag 1,2	Dag 0	Day 5
10-11	7	Antiviral 4 2 doses	p.o. dag 1,2	Dag 0	Day 5
12-13	7	Antiviral 5 2 doses	i.p. dag 1,2	Dag 0	Day 5
14-15	7	Antiviral 6 2 doses	i.p. dag 1,2	Dag 0	Day 5

Totaal ongeveer 114 dieren.

Het tweede overzicht beschrijft een voorbeeldstudie met enkele antivirale middelen in meerdere verschillende doses, waarbij ook bloed afgenomen kan worden.

Groep	N	Behandeling	Toediening	RSV	Bloedafname	euthanaseren
1	10-15	Vehicle	p.o. dag 1,2,3	Dag 0	1h na 1e dosis, 0.5h voor 2e dosis, 1h na laatste dosis en bij euthanaseren	Day 4
2	5	Positieve controle	p.o. dag 1,2,3	Dag 0	1h na 1e dosis, 0.5h voor 2e dosis, 1h na laatste dosis en bij euthanaseren	Day 4
3-7	5-7	Antiviral 1 5 doses	p.o. dag 1,2,3	Dag 0	1h na 1e dosis, 0.5h voor 2e dosis, 1h na laatste dosis en bij euthanaseren	Day 4
8-12	5-7	Antiviral 2 5 doses	p.o. dag 1,2,3	Dag 0	1h na 1e dosis, 0.5h voor 2e dosis, 1h na laatste dosis en bij	Day 4

					euthanaseren	
--	--	--	--	--	--------------	--

Totaal ongeveer 90 dieren

De biotechnische handelingen die toegepast worden in de challenge fase zijn dezelfde voor elke studie en worden hier onder beschreven:
Op dag 0 van de studie krijgen alle dieren een intranasale challenge met een dosis van x PFU (plaque forming units) van de geselecteerde RSV variant. RSV wordt intranasaal toegediend onder narcose, om zowel de neus, trachea en longen (bovenste en onderste luchtwegen) te kunnen infecteren. De dieren zullen onder anesthesie worden gebracht middels een voor het dier en model passend middel conform de code of good practice (van Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001)) en nader worden gespecificeerd in het studieplan. Na toediening van anesthesie krijgen de dieren 50 µL RSV toegediend, verdeeld in gelijke volumes van 25 µL per neusgat m.b.v. een pipet. De dieren worden op hun rug gehouden met het hoofd en de neus omhoog en 25 µL wordt toegediend aan het eerste neusgat. Nadat dit volledig is ingeademd, wordt op dezelfde manier de andere 25 µL in het tweede neusgat toegediend. De dieren worden nog in deze oriëntatie gehouden gedurende 15 seconden na doseren om ervoor te zorgen dat de gehele dosering wordt ingeademd. Voor het doseren van elk dier wordt een nieuwe, schone pipetpunt gebruikt.

De dieren worden gedurende een periode van ongeveer een week (gebaseerd op de resultaten van de validatiestudie en de vraagstelling, verder gespecificeerd in het studieplan) na infectie geobserveerd waarin lichaamsgewicht en klinische verschijnselen worden geregistreerd. (N.B.: indien het studiedesign het toelaat zullen de formuleringen met de medicijnen worden gecodeerd, zodat de biotechnici de studie dieren geblindeerd kunnen observeren). In iedere studie zal zowel een positieve als een negatieve controle groep worden meegenomen. De positieve controlegroep zal tijdens de behandelingsfase worden behandeld met Synagis®, of bij voortschrijdend inzicht een ander werkzaam middel. De negatieve controlegroep zal worden behandeld met vehicle (de drager van de te testen medicijnen).

Observaties en metingen

De observatie van klinische verschijnselen en lichaamsgewicht zal worden uitgevoerd volgens verschillende regimes afhankelijk van de pre- en post-infectiefase van de studie. De klinische verschijnselen ten gevolge van de RSV infectie kunnen de volgende zijn: benauwdheid, pilo-erectie, gebogen houding. Omdat de virale load in de longen piekt tussen dag 3 en 6 na infectie, zullen de klinische verschijnselen naar verwachting hiervoor zichtbaar zijn, omdat de ademhaling kan worden bemoeilijkt zodra door RSV infectie het longweefsel beschadigd raakt.

Klinische verschijnselen

Pre-infectie

Individuele dieren zullen worden geobserveerd voor het optreden van reacties op behandelingen alsook tekenen van ziekte of sterven. Observaties worden minstens eenmaal per dag uitgevoerd van de dag van indeling in de studie tot dag 0 (dag van infectie).

Post-infectie

Individuele dieren zullen worden geobserveerd voor het optreden van reacties op behandelingen alsook tekenen van ziekte of sterven. Observaties worden eenmaal of tweemaal per dag uitgevoerd (overdag, met een tijdsinterval van minstens 5 uur) afhankelijk van de resultaten uit de validatie studie(s), vanaf de dag van infectie tot het einde van de studie. Alle observaties, inclusief gedrag en individuele afwijkingen worden geregistreerd.

Lichaamsgewicht

Pre-infectie

Kort voor start van de studie zal voor elk dier het lichaamsgewicht worden bepaald, voor het indelen van dieren in de groepen. Dieren worden wekelijks

gewogen van dag -x (voor doseren) tot dag 0 (voor infectie).

Post-infectie

Van dag 0 tot einde van de studie worden dieren dagelijks in de ochtend gewogen.

Bloedafname

Indien nodig wordt op bepaalde tijdstippen bloed afgenomen van geselecteerde groepen (details worden beschreven in het studieplan). Bloed zal worden afgenomen conform de code of good practice (van Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001)).

Euthanasie

De dieren worden geëuthanaseerd conform de code of good practice of een andere geaccepteerde methode uit richtlijn 2010/63/EU, bijlage IV. De longen zullen worden gespoeld voor het verkrijgen van broncho-alveolaire lavage en de longen zullen worden ingevroren voor het analyseren van de virale load en/of pathologie (details worden beschreven in het studieplan).

Biotechnische handelingen gerelateerd aan behandeling met (nieuwe) medicijnen

Overige handelingen, die specifiek zijn voor de behandeling met (nieuwe) medicijnen zullen voor iedere individuele studie in het studieplan worden beschreven, inclusief de inschatting van het ongerief door deze handelingen. Naar verwachting zal het totale ongerief per proefdier door RSV infectie (benauwd worden, maximaal matig ongerief) niet wordt verhoogd door deze 'overige' handelingen.

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

Het aantal dieren in de validatiefase (5 muizen per tijdstip) komt overeen met beschrijvingen uit de literatuur (Mejías et al 2005, Lukacs et al 2006, Olszewska et al 2011, Mejías et al 2011). Als uit de validatiestudies blijkt dat dit aantal onvoldoende power geeft, zal dit worden aangepast in de vervolgstudies en nader worden toegelicht in het studieplan. Omdat alle groepen worden vergeleken met de negatieve controlegroep zal de grootte van deze groep zo worden gekozen dat voldoende power wordt verkregen wanneer deze groep meerdere keren wordt gebruikt in de statistische analyse.

B. De dieren

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

Voor het muismodel wordt bij voorkeur gebruikt gemaakt van vrouwelijke BALB/c muizen. **Verhoogde gevoeligheid in de luchtwegen na methacholinebehandeling is beschreven voor mannelijke muizen t.o.v. vrouwelijke muizen (Card et al 2006). Omdat het hier gaat om een infectie aan de luchtwegen gaat de voorkeur uit naar vrouwelijke muizen zodat er minder muizen per groep nodig zijn om de resultaten te behalen.** Vrouwelijke BALB/c muizen worden wereldwijd gebruikt voor studies met RSV en RSV infectie verloopt efficiënter in BALB/c muizen t.o.v. C57BL/6 muizen. Daar waar het noodzakelijk is om een andere muizenstam te gebruiken zal dit in het studieplan worden toegelicht. **Op dit moment en met de huidige kennis is de BALB/c muis het meest geschikte dier voor deze studies. Ontwikkelingen in muizenstammen gaan heel snel en binnen de termijn van deze aanvraag zou een andere stam voordelen kunnen hebben boven de BALB/c muis. Ook kan het zijn dat een opdrachtgever kennis heeft opgedaan in een voortraject in een andere muizenstam dan de BALB/c muis. Om resultaten te kunnen vergelijken en niet onnodig extra controles mee te moeten nemen, kan het dan de voorkeur hebben om door te gaan in een andere muizenstam. Mocht een van deze zaken aan de orde komen dan zullen wij onze overwegingen hierover voorleggen aan de IvD.**

Tenzij anders vermeld in het studieplan, zullen muizen van 6-8 weken oud bij aanvang van de studie worden gebruikt. Het totaal aantal dieren per studie kan variëren en is afhankelijk van het aantal groepen en de groepsgrootte. Het aantal groepen in een studie wordt bepaald door de vraagstelling en de groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de validatiestudie. Gebaseerd op een verwacht aantal studies van 10-12 per jaar met 80-150 dieren wordt het maximaal aantal dieren op maximaal 9000 geschat over een periode van 5 jaar (12 studies x max. 150 dieren x 5 jaar).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

De medicijnen die in RSV muismodellen getest worden, zijn geselecteerd op basis van *in vitro/ex vivo* efficacy experimenten. Alternatieven voor het nabootsen RSV infectie, bijvoorbeeld d.m.v. cel- of weefselkweek leveren een incompleet beeld van de effectiviteit van nieuwe medicijnen/vaccins. Het immuunsysteem is een dynamisch complex netwerk van diverse cellen en mediators. Bij RSV infectie heeft het immuunsysteem interactie met RSV en met het omringende longweefsel. Het is vooralsnog onmogelijk dit volledig na te bootsen *in vitro* of in "lagere" diersoorten. Vermindering van het aantal dieren kan op termijn aan worden gedacht als blijkt dat variatie binnen de groepen zeer klein is. Hierbij moet gedacht worden aan verkleinen van groepsgrootte. Daarnaast kunnen nieuwe ontwikkelingen in technieken zorgen voor verfijning van het model, daarbij wordt gedacht aan bijvoorbeeld non-invasieve imaging methodes.

Met behulp van statistiek wordt bepaald wat de optimale groepsgrootte is in deze experimenten, zodat met minimale hoeveelheid proefdieren de onderzoeksvraag kan worden beantwoord.

De proefdierstudies worden uitgevoerd volgens een vooraf vastgelegd protocol en door getrainde medewerkers. Hierdoor kent de dierproef een maximale kwaliteit, en worden stress en ongemak voor de proefdieren zo laag mogelijk gehouden. De RSV infectie kan een nadelig effect hebben op het welzijn van de muizen en daarom wordt hun gezondheid dagelijks gecontroleerd. Er zijn heldere afspraken om het ongerief voor de dieren zo veel mogelijk in te perken, muizen die meer dan matig ongerief ondervinden, worden uit de proef genomen op basis van de humane eindpunten die in de validatiestudie worden bepaald.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Er zal anesthesie worden toegepast bij de muizen conform de code of good practice (van Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23 (2001)).

De kans op nadelige milieueffecten worden beperkt door de experimenten uit te voeren onder biosafety level 2 (BSL-II) condities i.v.m. het gebruik van RSV

varianten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t. dit is geen wettelijk vereist onderzoek

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Eénmalige intranasale toediening van RSV onder verdoving: licht ongerief

Benauwd worden als gevolg van de RSV infectie: matig ongerief

Dagelijks wegen: licht ongerief

Behandeling met teststof: maximaal matig ongerief

Evt een of meermalen afnemen van bloed: licht ongerief

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

RSV infecteert het longweefsel, waardoor dit beschadigd raakt en het ademen kan worden bemoeilijkt en de dieren benaauwd kunnen worden.

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

Er worden geen maatregelen genomen om deze effecten te voorkomen. De benaauwdheid dient als (secundaire) uitleesparameter.

Wanneer er dieren zijn die door verzwakking niet meer bij voer/water kunnen, worden voerkorrels en hydrogel (steriel water gel voor hydratatie (98% puur water) op de bodem van de kooi aangeboden.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het optreden van zeer ernstige benaauwdheid, dit wordt bepaald aan de hand van pompende ademhaling en/of blauwkleuring van de slijmvliezen.

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

In de validatiefase zal dit naar verwachting niet meer dan 20% zijn. De infectiedosis en dag van euthanaseren worden zo gekozen dat in de fase van testen van medicijnen naar verwachting minder dan 5% deze criteria halen.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

De negatieve controlegroep zal benaauwd worden ten gevolge van de RSV infectie, door de moeizamere ademhaling wordt dit ingeschat op matig ongerief. De positieve controle groep kent licht ongerief, doordat Synagis[®] virale infectie remt. De groepen behandeld met teststof zullen naar verwachting licht **tot matig** ongerief ondervinden. Naar verwachting zal ongeveer 50% van de dieren licht ongerief en 50% matig ongerief ondervinden.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.
De primaire uitleesparameter is virale load in de longen, waarvoor de longen worden geïsoleerd na euthanaseren van de dieren.
Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?
☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.
☒ Ja



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO Triskelion BV

Postpunt 30
Postbus 360
3700 AJ Zeist

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD504002015107

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 13 Mei 2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 21 april 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Dierstudies in het kader van ontwikkeling van medicijnen voor het behandelen en voorkomen van virale infecties aan de luchtwegen, in het bijzonder respiratoir syncytieel virus" met aanvraagnummer AVD504002015107. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld. Op 28 april 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld op basis van door het secretariaat van de CCD gestelde vragen.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet), conform de aangevraagde periode van 03 juni 2015 tot 3 juni 2020. Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Dierstudies in het kader van ontwikkeling van medicijnen voor het behandelen en voorkomen van virale infecties aan de luchtwegen, in het bijzonder respiratoir syncytieel virus" starten.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie DEC-TNO gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: TNO triskelion BV

Adres: Postbus 360

Postpunt 30

Postcode en woonplaats: 3700 AJ Zeist

Deelnemersnummer: 50400

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 juni 2015 tot 3 juni 2020, voor het project "Dierstudies in het kader van ontwikkeling van medicijnen voor het behandelen en voorkomen van virale infecties aan de luchtwegen, in het bijzonder respiratoir syncytieel virus" met aanvraagnummer AVD504002015107, gebaseerd op het advies van Dierexperimentencommissie DEC-TNO.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 April 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 21 april 2015, en aangepast op 28 april 2015 na vragen van de CCD;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 21 april 2015, en aangepast op 28 april 2015 na vragen van de CCD;
 - c. Advies van dierexperimentencommissie d.d. 21 april 2015, zoals ontvangen bij digitale indiening op 21 april 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Respiratoir syncytieel virus (RSV) infectiemodel in muizen	Muis	9000/ 5 jaar	Licht tot matig	Vrouwelijke en mannelijke muizen in evenredige verhouding

Extra voorwaarden:

- 1) Zoals beschreven in de vergunningsaanvraag worden te testen medicijnen en vaccins eerst *in vitro* en *ex vivo* gekarakteriseerd en gescreend. De criteria voor de start van de *in vivo* experimenten dient voor de start van het project in overleg met de IvD vastgesteld te worden. Deze voorwaarde is toegevoegd om onnodig lijden van dieren te voorkomen.
- 2) Voor de start van het project dient, in overleg met de IvD, te worden vastgelegd hoe omgegaan wordt met opdrachten die weliswaar voldoen aan bovenstaande criteria, maar minder effectief zijn dan al gestarte dierproeven. Proeven die vooraf minder effectief zijn dan al gestarte dierproeven vallen niet onder deze vergunning. Deze voorwaarde is toegevoegd om onnodig lijden van dieren te voorkomen.
- 3) De aanvraag beschrijft het gebruik van vrouwelijke dieren. Op basis van wetenschappelijk literatuur onderzoek is de commissie niet overtuigd van de onmogelijkheid om beide geslachten te gebruiken. Voor dit project dienen beide geslachten in een evenredige verhouding gebruikt te worden. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

Verzorging

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

Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden,

angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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