



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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 90500 |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | BioXpert B.V. |
| 1.3 | Vul de titel van het project in. | Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen. |

2 Categorie van het project

- | | | |
|-----|--|---|
| 2.1 | In welke categorie valt het project. | ☐ Fundamenteel onderzoek |
| | | ☒ Translationeel of toegepast onderzoek |
| | <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | ☒ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie |
| | | ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de |
| | | ☐ 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.

De sponsor van deze studie heeft een universeel antilichaam preparaat ontwikkeld dat infectie van influenza A virus kan tegengaan door inhibitie van de vermenigvuldiging van het virus. Het werkingsmechanisme van dit antilichaam preparaat bestaat uit het neutraliseren van meerdere influenza type A virussen (zowel laag pathogene seizoensvirussen als hoog pathogene aviaire virussen) door het tegengaan van fusie van het virus met de gastheercel. Door middel van geavanceerde onderzoekstechnieken heeft de sponsor een epitoom gevonden in het oppervlakte eiwit van influenza dat geconserveerd is in alle bekende influenza type A virussen en dat vanwege het conformationele karakter van het oppervlakte eiwit niet gevoelig is voor resistentie mutatie. Vanwege het breed toepasbare karakter van dit middel is het in staat om infectie van zowel laag (seizoens) en hoog (pandemisch) pathogeen influenza virus te voorkomen. Daarnaast kan het middel ingezet worden als behandeling van reeds met influenza geïnfecteerde personen.

Echter de regelgevende autoriteiten (FDA en EMA) hebben de sponsor van de studie opgelegd om te bepalen of lage (sub-neutraliserende) doses van het antilichaam preparaat geassocieerd zijn met een verergerd ziektebeeld, ook wel antilichaam afhankelijke verergering (ADE: antibody dependent enhancement) genoemd. Dit fenomeen is in het verleden reeds aangetoond voor verschillende virale infecties in de meeste gevallen in vitro, maar in een aantal gevallen ook in vivo. Zeer recentelijk zijn bewijzen gevonden dat een dergelijk fenomeen ook bij influenza infecties het geval zou kunnen zijn. Tijdens de uitbraak van Mexicaanse griep in 2009 is een verergerd ziektebeeld aangetoond bij meerdere patiënten welke in het verleden gevaccineerd waren met een seizoens influenza vaccin welke niet de Mexicaanse griep component bevatte (Skowronski; PlosMedicine 2010). In een vervolg in vitro studie werd aangetoond dat niet volledig overeenkomende antilichamen een verhoging van de infectie veroorzaakten in plaats van dat ze het virus neutraliseerden. Dit werd bevestigd in een fretten studie, waarin het risico van verergerd ziektebeeld werd aangetoond na vaccinatie met het 2008-2009 influenza vaccin en challenge met het Mexicaanse griep virus (welke niet was vertegenwoordigd in het vaccin)(Skowronski; PlosOne 2014). Dit fenomeen is vervolgens nagebootst in het varken-model in een soortgelijke opzet (Gauger Vaccine 2011).

In opeenvolgend onderzoek waarin het mechanisme achter deze verergering van het ziektebeeld werd bestudeerd, werd gevonden dat kruis-reactieve haemagglutinine (HA)-bindende antilichamen geassocieerd waren met het verergerde ziektebeeld. Antilichamen geïnduceerd door de vaccinatie neutraliseerden wel het vaccin-virus, maar konden alleen binden aan het challenge virus zonder neutraliserende capaciteit. Er werd aangetoond dat de antilichamen, die wel konden binden maar het virus niet konden neutraliseerden, een verandering in het HA eiwit induceerden. Deze verandering zorgde ervoor dat fusie van het virus met de gastheercellen makkelijker ging en daardoor de infectie bevorderde. Structurele analyse van het antilichaam preparaat dat uitgetest zal worden in deze studie heeft aangetoond dat binding aan het HA eiwit niet deze conformationele verandering induceert. Naast dit mechanisme van conformationele verandering kan ADE ook geïnduceerd worden door een Fc-gemedieerd proces. Bij dit proces kunnen de viruspartikel-antilichaam complexen verhoogd opgenomen worden door macrofaag-achtige cellen via hun Fc-receptor en vervolgens deze cellen infecteren. Echter, voor meerdere antilichaam preparaten is reeds aangetoond dat Fc interactie leidt tot een effectievere behandeling in plaats van verergering van infectie/ziektebeeld.

In de hier beschreven studie zullen alle hierboven omschreven aspecten bestudeerd worden. Er is reeds aangetoond dat het te testen antilichaam een interactie aan kan gaan met de receptoren op de macrofagen van de muis, zodat zowel bestudeerd kan worden of deze Fc interactie een beschermende dan wel verergerende capaciteit induceert. De doseringen die uitgetest zullen worden volgen een range van volledig neutraliserende (20 mg/kg zoals al eerder door de opdrachtgever is aangetoond, maar niet beschikbaar is in het publieke domein) tot sub- en niet-neutraliserende waarden. Als uitleesparameter zal zowel gekeken worden naar virale load in de longen (als marker voor veiligheid) als naar klinische verschijnselen (als marker voor effectiviteit). Het translationele karakter van de hierboven genoemde effectiviteit in het influenza muismodel is al eerder beschreven voor influenza-specifieke antilichaam preparaten welke op dit moment al uitgetest worden in de kliniek in zowel profylactische als therapeutische setting (Ekiert et al, Science, 2011), maar ook in-huis gegenereerde data van soortgelijke preparaten welke nog niet in het publieke domein zijn.

Aangezien het hier gekozen muismodel gebruikt kan worden voor zowel de bestudering van bescherming tegen infectie na behandeling als verergering van het ziektebeeld (zie voor beide punten de tekst hierboven), kunnen de resultaten gebruikt worden voor de vervolgstappen van het hier uit te testen antilichaam preparaat, namelijk voorkoming van influenza infectie en behandeling van influenza geïnfecteerde personen. Omdat het antilichaam preparaat, indien het werkingsmechanisme beschermend is en niet verergerend, zowel gebruikt kan worden voor behandeling van individuen geïnfecteerd met laag pathogene seizoensvirussen als hoog pathogene aviaire virussen, kunnen de resultaten van deze studie gebruikt worden om het antilichaam preparaat uit te testen in influenza geïnfecteerde individuen zoals omschreven in het maatschappelijk belang (zie punt 3.3). In de huidige studie zullen twee prototype influenza A virussen gebruikt worden. Het jaarlijkse influenza vaccin bevat altijd een H1N1 en een H3N2 virus en de hier gekozen virussen vallen in 1 van deze twee klassen; daarnaast zijn dit virussen die door middel van muis adaptatie meer pathogeen zijn in muizen. Aangezien de resultaten gebruikt zullen worden voor een go-no go van een klinisch programma, zullen in verband met de tijdslijnen beiden virussen in 1 en dezelfde studie gebruikt gaan worden.

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?

Het doel van het project is de bestudering van de effectiviteit en veiligheid van het hier uit te testen antilichaam tegen infectie met influenza virus. Op basis van voorbereidend onderzoek (structurele analyse van viruspartikel-antilichaam complexen en Fc-receptor binding) is de verwachting dat dit preparaat niet zal leiden tot verergering van het ziektebeeld zoals omschreven bij de achtergrond. Echter dit onderzoek is opgelegd vanuit de regelgevende autoriteiten en vanuit dat oogpunt noodzakelijk/verplicht. Aangezien in eerdere experimenten aangetoond is dat 20 mg/kg het virus volledig kan neutraliseren, zal deze dosering in dit experiment één van de gate-keepers zijn (isotype controle welke niet zal beschermen zal de andere gate-keeper zijn). De lagere verdunningen zullen dienen als uitleesparameter voor verergering, maar kunnen daarnaast ook aanwijzingen leveren over de minimale ondergrens van dit preparaat. Binnen deze studie zijn er dus twee uitkomsten mogelijk waarvan de tweede optie op basis van voorwerk het minst aannemelijk is:

1. Bescherming tegen infectie/ziekte (effectiviteit)
2. Verergering van infectie/ziekte (veiligheid)

3.3 Belang

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

Er is een constante dreiging op het uitbreken van een humane influenza pandemie. Voorbeelden hiervan zijn de voortdurende uitbraak van H5N1 virussen (vanaf 1997), de humane H7N7 gevallen (2003), de uitbraak van Mexicaanse griep in 2009 en het opkomen van H5N8 zeer recent. Sinds 19 februari 2013 behoort ook het H7N9 influenza virus tot de virussen die geïntroduceerd zijn in de humane populatie en waartegen geen natuurlijke bescherming bestaat. Infectie met deze (vaak hoog pathogene) pandemische influenza virussen leidt in veel gevallen tot een zware lagere luchtweginfectie en op het moment van de uitbraak zijn er nog geen specifieke vaccins beschikbaar. Daarnaast is er elk jaar druk van seizoens influenza virussen die een hoge mortaliteit en morbiditeit induceren en daardoor een hoge economische impact hebben. Helaas blijkt dat resistentie ontwikkeling tegen de bestaande antivirale therapieën steeds vaker wordt aangetoond bij zowel pandemische als seizoens influenza virussen. Derhalve is men op zoek naar alternatieve profylactische en therapeutische behandelmethoden tegen infectie met influenza virussen. Voor hoog pathogene (mogelijk pandemische) influenza virussen zal het gebruik van dergelijke preparaten voornamelijk zijn op therapeutische basis aangezien op voorhand niet te voorspellen valt wanneer de volgende influenza pandemie zal komen. Echter er kan wel gedacht worden bij het daadwerkelijk uitbreken van een pandemie om kwetsbare doelgroepen op voorhand te beschermen,

waarbij men kan denken aan longpatiënten, immuungecompromitteerden en medisch personeel dat geïnfecteerde individuen zal behandelen). Voor de laag pathogene seizoens influenza virussen zal het gebruik juist voornamelijk op profylactische basis zijn (dus juist voor de start van het influenza seizoen, indien de halfwaarde tijd dusdanig goed is. Een dergelijk regime is al beschikbaar voor een andere infectieziekte die vooral bij jonge kinderen met onderliggend leiden problemen geeft, namelijk respiratoir syncytieel virus (RSV). Deze kinderen worden voor het begin van het RSV seizoen behandeld met een antilichaam preparaat (en ook 1 of 2 keer tijdens het seizoen) en daarin ziet men een afname van RSV-gerelateerde ziekte. Een dergelijk regime zal ook geschikt zijn voor profylactische behandeling tegen influenza infecties in kwetsbare doelgroepen. Daarnaast is het uiteraard ook mogelijk om het middel in te zetten als therapeuticum bij individuen die op voorhand niet behoren tot de kwetsbare doelgroepen, maar na infectie met laag pathogeen influenza virus toch ernstige symptomen laten zien. Het universele antilichaam preparaat dat in deze studie uitgetest zal worden en dat in staat is een influenza infectie te remmen/ te stoppen en/of het ziektebeeld te kunnen verminderen, is een voorbeeld van een preparaat dat voor bovenstaande doeleinden (profylactische en therapeutische behandeling) gebruikt kan worden. Echter naast een bescherming van de ziekte is het mogelijk dat behandeling met een dergelijk universeel antilichaam preparaat verergering van ziekte kan induceren zoals beschreven na de uitbraak van Mexicaanse griep virus. Op basis van deze en andere resultaten hebben de regelgevende instanties (in dit geval de Amerikaanse "Food and Drug Administration") besloten dat elk influenza-specifiek universeel antiviraal middel getest moet worden op zowel effectiviteit/werkzaamheid als op veiligheid.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

In deze studie zullen dieren na infectie met de twee verschillende laag-pathogene seizoens influenza virussen (H1N1 en H3N2) therapeutisch behandeld worden met verschillende doseringen van het universele influenza-specifieke antilichaam preparaat en als controle zal een niet specifiek antilichaam preparaat meegenomen worden voor beide uit te testen virussen. Dit niet specifieke antilichaam preparaat is een isotype controle (zelfde type antilichaam als het influenza specifieke, echter met een niet relevante specificiteit) en zal dienen als negatieve controle binnen het experiment. Deze negatieve controle groepen zijn nodig om de vraag te beantwoorden of de observaties na toediening van het specifieke preparaat geassocieerd zijn met het toedienen hiervan of met de specifieke herkenning van het virus door het preparaat. Voor deze studie is gekozen voor twee seizoens-influenza virussen welke aangepast zijn aan de muis, zodoende kunnen dieren met een relatief lage dosis geïnfecteerd worden en lijkt de infectie dosis op dat van een natuurlijke infectie in de mens. Alhoewel hier gesproken wordt over laag-pathogene virussen, zal het ongerief door infectie toch geklassificeerd worden als matig (Time Course en kortlopend deel van effectiviteit en veiligheid) of ernstig (langlopende deel van effectiviteit en veiligheid). Dit komt omdat het karakter "laag-pathogeen" slaat op de ziekte die het zou veroorzaken bij infectie van mensen (het betreffen hier seizoens-influenza virussen). Echter door adaptatie aan de muis zijn deze virussen pathogener geworden in de muis, vandaar de combinatie "laag-pathogeen" en "matig of ernstig ongerief". Zowel de bescherming als de veiligheid zullen onderzocht worden op basis van onderstaande parameters:

1. virale load (tijdstip zal bepaald worden in het eerste experiment "Time Course")
2. klinische observaties (gedrag, uiterlijk, gewicht en mortaliteit) over een looptijd van 14 dagen
3. pathologie op 14 dagen na infectie

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

Experiment 1: Time course

In dit experiment zal bepaald worden op welke dag na infectie de piek van de virus replicatie plaatsvindt en deze resultaten zullen gebruikt worden om experiment 2 "Effectiviteit en veiligheid" te verfijnen. In dit experiment 1 zullen muizen geïnfecteerd worden met een virale dosis zoals eerder bepaald in dose-finding studies waarbij de dieren een sublethale infectie zullen krijgen. Op verschillende momenten na infectie (dag 0 t/m dag 5) zullen per virus (H1N1 of H3N2) vijf dieren uit de studie gehaald worden voor het bepalen van de virale load in de longen.

Experiment 2: Effectiviteit en veiligheid

In dit experiment zullen dieren eerst geïnfecteerd worden op dezelfde wijze als in experiment 1, echter zullen alle dieren op 24 uur na infectie behandeld worden met ofwel het universele antilichaam preparaat ofwel het controle preparaat. Relatief kort na infectie (zoals bepaald in experiment 1 "Time Course") zal per groep een aantal dieren uit de studie gehaald worden voor het bepalen van de virale load in de longen als marker voor veiligheid. De resterende dieren zullen vervolgens bestudeerd worden op basis van klinische observaties (als marker voor effectiviteit) tot 14 dagen na infectie. Op dag 14 (of eerder indien dieren het humane eindpunt bereiken) zullen de dieren uit de studie gehaald worden.

NB: voor een meer gedetailleerde beschrijving van de afzonderlijke dierproeven zie de bijlagen: beschrijving dierproef 1 en 2.

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.

Experiment 1 "Time Course" zal het voorbereidende werk zijn voor het experiment 2 "Effectiviteit en veiligheid". Resultaten uit experiment 1 zullen aantonen op welke dag na infectie de piek van de replicatie in de longen zal plaatsvinden en deze resultaten zullen gebruikt worden om het eerste euthanasie moment te bepalen na infectie in experiment 2 "Effectiviteit en veiligheid".

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Time Course
2	Effectiviteit en veiligheid
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV



Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD905002015121

Bijlagen

2

Datum 29-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 juni 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002015121. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 90500
Naam instelling of organisatie: BioXpert BV
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 54838134
Straat en huisnummer: Nistelrooise Baan 3
Postcode en plaats: 5374 RE SCHAIJK
IBAN: NL72RABO0183605888
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: BioXpert BV

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? ☒ [x] Nieuwe aanvraag
☐ [] Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
☐ [] Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juli 2015
Geplande einddatum: 1 juli 2017
Titel project: Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen.
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de werkzaamheid en veiligheid van een medicijn tegen infectie met influenza virus in muizen.
Naam DEC: Stichting DEC consult
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☐ Projectvoorstel
- ☐ Beschrijving Dierproeven
- ☐ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Schaijk

Datum:

25 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD905002015121

Bijlagen

2

Datum 29-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 29 juni 2015

Vervaldatum: 29 juli 2015

Factuurnummer: 201570121

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015121	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

- Strekking van de vragen ter completering van de aanvraag:
 - Doelcategorie project
 - Achtergrond, doelstelling en belang
 - Keuzes en onderbouwing bij de voorgestelde aanpak.
 - De onderbouwing van de inschatting van het ongerief.
 - De 3V alternatieven.
 - Het invullen van vraag E in de bijlage (wettelijk voorgeschreven onderzoek).
 - Onderscheid tussen pijn (vraag H) en ongerief (vraag I)
 - De leesbaarheid van de NTS
 - Het aansluiten van de NTS bij de project beschrijving..
- Datum antwoord 21 mei 2015
- Strekking van het (de) antwoord(en)
 - De antwoorden hebben geleid tot bijstellingen van de concept aanvraag.
- Datum 28 mei 2015
- Strekking van de vraag / vragen
 - Doel/belang (de wettelijk eis vanuit de FDA)
 - De beoogde doelgroep van het te testen middel.
 - Het opvoeren bij verfijning van handelingen die standaard zijn bij het houden van proefdieren.
 - Bij ernstig ongerief rapportage achteraf.
 - Verbetering NTS
- Datum antwoord 4 juni 2015
- Strekking van het de antwoorden
 - De antwoorden hebben geleid tot bijstellingen van de concept aanvraag..
- Datum 11 juni 2015
- Strekking van de vraag / vragen
 - De te gebruiken dieren
 - Inkorten van de NTS
 -
- Datum antwoord 12 juni 2015
- Strekking van het (de) antwoord(en)

- De antwoorden hebben geleid tot completering van de aanvraag
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt de DEC zelf beschikt over de relevante expertise

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunning plichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren
4. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project of de aanvrager.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
 - X wettelijk vereist (de FDA eist dit onderzoek in verband met de veiligheid van het product voordat dit bij de mens kan worden toegepast.)
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategoriën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstellingen. Naast een onmiskenbaar wetenschappelijk belang zullen de uitkomsten van dit onderzoek aantonen of het gebruik van het te testen middel veilig is om bij de mens te worden toegepast en niet onbedoeld een patient ernstiger ziek maakt in plaats van geneest. Het belang wordt ingeschat als essentieel, mede gezien het risico op ernstige ongewenste neveneffecten bij ongecontroleerde toepassing bij de mens.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen van het project. De aanvrager heeft de kennis en de expertise om de voorgestelde experimenten uit te voeren.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De toegepaste methode van anesthesie en euthanasie zijn conform de richtlijn.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor dieren die ernstige longontsteking krijgen wordt ingeschat als ernstig, maar door intensieve monitoring en toepassing van humane eindpunten zal de duur hiervan zo veel mogelijk beperkt worden.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Het te onderzoeken middel is voorafgaand al in vitro op gunstige eigenschappen getest. Het mogelijk verergeren van ziekte door dit middel kan alleen in het intacte dier worden bestudeerd.
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.
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
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

Gezien de ernst van een influenza infectie bij kwetsbare groepen patiënten en het feit dat de huidige anti-virale middelen niet altijd werkzaam blijken te zijn, is de commissie van mening dat het ethisch toelaatbaar is voor de ontwikkeling van preventieve strategieën ter voorkoming van influenza proefdieronderzoek in te zetten. De ervaring uit het verleden dat een middel juist een averechts effect kan hebben maakt dit onderzoek essentieel voordat dit middel bij kwetsbare patiënten kan worden toegepast. Uitvoering van het project levert voordelen op voor de mens. De schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het verwachte resultaat.

Het project dient ook een belangrijk wetenschappelijke doel en het is zeer waarschijnlijk dat ook deze doelen worden gehaald.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van de wettelijk vereiste (risico op (kortdurend) ernstig ongerief) dient de projectleider bij beëindiging van het project een rapportage aan te leveren aan de CCD die is afgestemd met de IvD.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert B.V.	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Time Course

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.

Dit time course experiment is nodig om te bepalen op welke dag na infectie met influenza virus de piek van de replicatie in de longen zal plaatsvinden. Virale load is dan ook de primaire uitkomstparameter. Deze resultaten zullen gebruikt worden om het eerste euthanasie moment te bepalen na infectie in dierproef 2 "Effectiviteit en veiligheid".

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.

Dieren zullen op dag 0 intranasaal geïnfecteerd worden met ofwel muis-geadapteerd H1N1 ofwel muis-geadapteerd H3N2 influenza virus. Deze route is normaal ook de port-d'entree voor dit virus. Op dag 0 t/m 5 zal elke dag een vast aantal dieren per virus geëuthanaseerd worden. De longen zullen gebruikt worden voor het bepalen van de virale load. Daarnaast zullen de dieren elke dag geobserveerd worden, klinische score genoteerd worden en lichaamsgewicht gemeten worden. Op basis van het bereiken van het humane eindpunt kunnen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald, echter eerste resultaten van deze virussen in de hier te gebruiken muizenstam (uitgevoerd onder een ander vergund protocol) hebben laten zien dat tijdens de looptijd van deze kortdurende studie van 5 dagen geen humaan eindpunt bereikt zal worden.

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

De dose finding experimenten van de hier te gebruiken virussen in combinatie met deze muizenstam zullen elders uitgevoerd worden door derden. Resultaten van deze dose finding zullen gebruikt worden om de optimale virus dosis te bepalen voor dit experiment. Daarnaast zal er rekening gehouden worden in dit experiment met de gevonden statistische spreiding in de dose finding experimenten.

Geschat maximum aantal: 120 dieren

Onderbouwing: 30 dieren per virus (60 dieren in totaal) en daarnaast de mogelijkheid om de groepsgrootte te verhogen indien resultaten in de voorbereidende experimenten hiertoe aanleiding geven (zie hierboven). De verwachting is dat dit niet leidt tot meer dan het dubbele aantal dieren, dus het geschatte maximum aantal voor deze studie zal 120 dieren zijn. Echter, als de resultaten van de voorbereidende dierstudies (dose finding door derden) laten zien dat dit hoge aantal niet nodig is op basis van statistische spreiding, zal de studie uiteraard aangevangen worden met minder dieren. Aangezien deze resultaten nog niet beschikbaar zijn, kan op voorhand de kans hierop niet ingeschat worden. In de studie zullen dieren geïnfecteerd worden met H1N1 of H3N2 en op de verschillende dagen na infectie (dag 0 t/m dag 5) zal per virus 5 dieren per groep geëuthanaseerd worden. Op basis van eerdere resultaten, reeds gepubliceerde data en de gekozen dosis is het de verwachting dat het influenza virus zal repliceren in alle dieren. In dit experiment zijn we op zoek naar de dag waarop de piek van de replicatie plaatsvindt. Aangezien de verwachting is dat alle dieren geïnfecteerd worden, kan op basis van de publicatie van Richardson en Overbaugh (JV 2005, Tabel 2) geconcludeerd worden dat met 5 dieren per groep een significant verschil ($p < 0.05$) aangetoond kan worden tussen geïnfecteerde dieren (dag 1 t/m 5) en controle dieren (dag 0).

B. De dieren

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

Diersoort: vrouwelijke CD-1 muizen.

Experiment 2 (effectiviteit en veiligheid) zal gericht zijn op het wel of niet induceren van antilichaam afhankelijke verergering. Voor de bestudering hiervan dient een muizenstam gebruikt te worden met een compleet immuunsysteem, aangezien het immuunsysteem een grote rol speelt in het proces van antilichaam afhankelijke verergering. Voor de studie naar antilichaam afhankelijke verergering dient een zo wild-type mogelijk immuunsysteem beschikbaar te zijn. In het algemeen kunnen inteelt muizenstammen vanwege hun inteelt-karakter deficiënt zijn op 1 of meerdere vlakken van het immuunsysteem en derhalve minder geschikt om een dergelijk complex systeem als het immuunsysteem te bestuderen (het is nog steeds niet volledig bekend welke deficiënties een invloed hebben op zowel het aspecifieke als adaptieve deel van het immuunsysteem). Outbred muizen daarentegen kunnen worden gezien als immuuncompetente muizen en zijn dan ook beter geschikt om dit soort experimenten uit te voeren. Daarnaast zijn in de literatuur meerdere studies beschreven voor andere virale infecties met onder andere Dengue virus en Ebola virus (Puerta-Guardo et al Journal of Virology 2013) en is deze muizenstam ook gebruikt voor het genereren en uittesten van muis-geadapteerd influenza virus (Brown PNAS 2001). In deze experimenten zal gebruik gemaakt worden van vrouwelijke muizen om agressie binnen de groepen tot een minimum te beperken.

Herkomst: geregistreerde fokker in de EU

Levensstadium: 6-8 weken oud bij start van het experiment

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.

Vervanging: deze dierproef is opgezet om de replicatie kinetiek van de twee muis-geadapteerde influenza virussen te bestuderen in de longen van muizen. Een dergelijke studie is niet mogelijk in een in vitro model en derhalve is het niet mogelijk om dit in vitro uit te voeren. Vooraf zal wel zeer nauwkeurig bepaald worden in in vitro kweeksystemen wat de titer is van de hier uit te testen influenza stock, zodat de studie

weloverwogen ingezet kan worden.

Vermindering: Tijdens de studie zullen zo veel mogelijk parameters beoordeeld worden in deze studie (virologie, pathologie en klinische observaties), zodat zoveel mogelijk waarnemingen uit een dier verkregen worden.

Verfijning: Meest invasieve handelingen (intranasale infectie en euthanasie) zullen uitgevoerd worden onder sedatie (isofluraan 3% / O₂). Daarnaast zullen de dieren dagelijks gewogen worden. Observaties worden geïntensiveerd naarmate de klinische verschijnselen toenemen. Daarnaast is besloten na literatuur onderzoek om de looptijd van deze time-course te beëindigen op dag 5 na infectie. Eerdere studies hebben laten zien voor verschillende influenza virus / muizenstam combinaties, dat de piek van de virus replicatie zal liggen binnen deze tijdsperiode en dat latere tijdstippen geen toegevoegde waarde hebben. Daarnaast is het zo dat alhoewel binnen deze tijdsperiode de hoogste virale load in de longen zal zijn, de klinische verschijnselen zich pas later zullen manifesteren. Deze werkwijze zorgt ervoor dat zo min mogelijk dieren gebruikt wordt, maar ook dat de studie gestopt wordt voor het ontwikkelen van klinische verschijnselen (ongerief).

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.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat dieren gehuisvest zullen worden in HEPA gefilterde IVC bakken, handelingen uitgevoerd zullen worden in een veiligheidskabinet en afval (bedding, kadavers en andere materialen gebruikt in de studie) aangeboden zal worden voor destructie. De gehele studie wordt uitgevoerd onder BSL II ingeperkte condities.

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.

Met behulp van literatuur studie is gekeken of eerdere experimenten uitgevoerd zijn, waarin een dergelijke vraagstelling is bestudeerd. In de literatuur zijn meerdere studies beschreven waarin muis-geadapteerde influenza virussen zijn bestudeerd. Echter, in deze studie betreft het een nieuw opgegroeid virus, waarvan niet bekend is of de kinetiek van de infectie hetzelfde verloop heeft. Wel kan uit deze studies (en eerder zelf uitgevoerde maar niet publiekelijk beschikbare studies) gedestilleerd worden dat de piek van de replicatie binnen 5 dagen na infectie zal plaatsvinden en derhalve zal deze studie ook niet langer duren dan 5 dagen. Reeds gepubliceerde studies hebben over het algemeen langere looptijden tot wel 10-14 dagen na infectie. Tevens betreft het hier voorwerk voor dierproef #2, een studie die vanuit regulatorisch oogpunt uitgevoerd dient te worden voordat het hier uit te testen antilichaam preparaat in een klinische studie uitgetest kan worden.

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 > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. kortademigheid en gewichtsverlies
2. Eventuele verwondingen door agressie binnen de groep. Kans hierop is klein, maar kan nooit uitgesloten worden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. longontsteking door infectie met influenza
2. Gebruik van dieren die voorheen niet samen gehuisvest waren.

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

1. De looptijd van de studie is dusdanig dat deze verschijnselen niet verwacht worden. Echter indien wel schadelijke effecten gezien worden, is het niet mogelijk om analgetica (NSAID, aspirine of paracetamol) te gebruiken. In het algemeen hebben deze middelen een ontstekingsremmende werking en zullen dus in het hoofdexperiment (2: effectiviteit en veiligheid) nooit gebruikt kunnen worden. In dit experiment zal worden onderzocht hoe het ziekteproces verloopt en daarbij is een goed functionerend immuunsysteem vereist. Voorbereidend werk kan dan niet uitgevoerd worden met dergelijke analgetica.
2. Dieren zullen zover mogelijk besteld worden uit een grote batch die bij de fokker al in 1 groep gehuisvest waren. Daarnaast zullen de experimenten uitgevoerd worden met vrouwelijke dieren, aangezien agressie onderling minder aannemelijk is dan bij groepshuisvesting van mannelijke dieren.

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.

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden op de volgende criteria en bij matig ongerief (klinische score 3) uit de proef worden gehaald door middel van euthanasie:

- 0. Geen klinische verschijnselen (geen ongerief)
- 1. Ruwe vacht (gering ongerief)
- 2. Ruwe vacht, verminderd alert, passief bij handelingen (gering ongerief)
- 3. Ruwe vacht, ineengedoken, bemoeilijkte ademhaling, passief bij handelingen (matig ongerief)

- 4. Ruwe vacht, ineengedoken, bemoeilijkte ademhaling, lethargisch (ernstig ongerief).

Daarnaast zullen de dieren uit de proef gehaald worden als de dieren niet meer zelfstandig water en/of voer tot zich kunnen nemen.

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

Op basis van voorbereidend werk is de verwachting dat de kans op humaan eindpunt score 3 of 4 = 0% zal zijn. 100% van de dieren zal kans hebben op het verkrijgen van klinische score 1 en naar schatting 50% van het oorspronkelijke aantal dieren klinische score 2.

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.

Op basis van de hierboven beschreven negatieve effecten en het voorbereidende werk zal het cumulatieve ongerief ingeschaald worden op gering, met andere woorden bij kortdurend matig ongerief zullen de betreffende dieren uit de studie gehaald worden.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Dieren zullen worden gedood om vervolgens de virale load in de longen te bepalen. Deze bepaling is niet mogelijk bij het in leven blijven 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

Appendix**Description animal procedures**

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure orthotopic (femoral condyle) and ectopic (subcutaneous) implantation

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The experiment will use the 6 experimental groups as described in section 3.4.1 for implantation in femoral condyle defects as well as subcutaneous in the same animals. These experimental groups consist of bone regenerative constructs based on calcium phosphate ceramic granules, either or not combined with (combinations of) human cells (i.e. adipose tissue derived mesenchymal stem cells, stromal vascular fraction, monocytes, or combinations thereof; mesenchymal stem cells and stromal vascular fraction are obtained from healthy donors after informed consent, monocytes are from a human monocytic cell line).

To study the biological performance (i.e. bone regenerative capacity) of (cell-laden) constructs, a femoral condyle implantation model (orthotopic) will be used. The model involves the creation of a cylindrical bone defect (diameter 3 mm, depth 3 mm) by drilling into the femoral condyle bone from the knee joint. As such, a bone defect will be obtained characterised by trabecular bone.

The primary outcome parameters will be obtained following histological sectioning; within the sections, a region of interest (ROI) will be determined by imposing a circle with the same diameter as that of the original bone defect. Subsequently, the bone area and particle area will be determined histomorphometrically within this ROI. Additionally, the general tissue response and appearance will be evaluated by histological assessment via descriptive histology.

To study the bone forming capacity of (cell-laden) constructs, it is mandatory to implant such constructs ectopically (= outside native bone tissue). As such, the formation of bone tissue can be clearly attributed to the cells within the constructs, rather than to surrounding bone tissue when these constructs would be placed orthotopically (in a bone defect).

The primary outcome parameter is bone formation (yes/no) and histomorphometrical amount of formed bone (%bone tissue within the construct area). Additionally, histological assessment via descriptive histology will be used to identify the characteristics of both formed bone and tissue responses (e.g. angiogenic responses).

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

The animals will be anaesthetized ~30 minutes after administration of a painkiller and placed in dorsal position. When under full anaesthesia, a skin incision will be made in the knee area, after which the knee will be fully flexed. After incision of the fascia, the knee joint will be exposed, the patella will be pushed aside, and the femoral condyle will be used to drill a bone defect using sequential drilling with dental drills of increasing diameter (final diameter 3 mm). Then, the construct will be placed, the fascia will be closed, and finally the skin will be closed with a running intracutaneous suture. This procedure will be followed for both knees per animal.

While still fully anaesthetized, the animals will be placed in ventral position, after which 4 dorsal subcutaneous pockets will be created per animal (2 on each side of the spine) by blunt dissection. Then, constructs will be inserted into these pockets and the wound will be closed with a running intracutaneous suture.

The animals will be given painkillers pre- and post-surgery.

In order to be able to evaluate bone formation/regeneration at both an early and late stage after construct implantation, animals will be sacrificed after 4 and 12 weeks. These time points have been shown effective to determine histological aspects and histomorphometrical parameters in numerous previous publications using this animal model (van Houdt et al., Biomed Mater 2015; Alghamdi et al., Biomaterials 2014; Nejadnik et al., Biomaterials 2014; van de Watering et al., Biomed Mater 2013).

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

Sample size calculation for this experiment will be performed in line with the requirements of the Animal facility of Radboud University Nijmegen, and based on the existing literature and the experience of the research group. For this purpose the formula: **$n = 1 + 2 C (s/d)^2$** will be used.

Within this formula, standard deviation (s) and magnitude of the effect to be detected (d) will be implemented by reviewing the scientific literature on histomorphometric analysis of bone area with this implantation model. Typically, the number of required samples per experimental group ranges from 5 to 8 (using 7.85 as the C value; power 0.8 and level of significance 0.05).

B. The animals

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

As the created bone defects will be filled with cell-laden constructs containing human cells, immune-compromised rats need to be used. The femoral condyle bone defect in rats is a well-described orthotopic implantation model that allows for accurate bone defect creation and subsequent filling of the defect with bone substitute material or cell-laden constructs.

In view of this, the animals to be used will be:

- rats (smallest mammals to reliably create bone defects)
- nude (immune-compromised to avoid undesired responses against human cells within the constructs)
- male (larger bones, hence larger femoral condyles for the creation of a 3 mm bone defect)

The choice is to use healthy, mature (9-week old), male, nude rats (CrI:NIH-Foxn1^{rn}nu).

The number of animals depends on the sample size calculation; with 6 experimental groups (see section 3.4.1) and typically 5-8 samples per group, the required maximum number of animals for 1 implantation period would be 24. As 2 implantation periods will be used (4 and 12 weeks) for both orthotopically and ectopically implanted constructs, the total number of animals will be 48.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rat (Crl:NIH-Foxn1rnu)	charles river	-48	adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

The same animals will be used for subcutaneous implantation of the implants (ectopic implantation to study bone forming capacity).

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

☒ No

☐ Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

Biological processes, including bone formation and regeneration via (cell-laden) constructs, cannot be mimicked in cell culture or organ culture models. Consequently, laboratory animals are required to answer the scientific question as to what extent the different constructs studied in this experiment are capable to induce bone formation (ectopic implantation) and regenerate bone defects (orthotopic implantation).

The choice for (nude) rats is based on the well-described femoral condyle bone defect model in this species. As such, this species is the smallest mammalian animal to reliably create bone defects to study bone regeneration of non load bearing bone substitute materials/cell-laden constructs.

Reduction

The number of required animals will be based on a sample size calculation, which makes that the minimum number of animals to obtain useful scientific data will be determined. As such, no excess numbers of animals will be used nor will a too low number of animals be used that would make the outcome scientifically questionable. The number of laboratory animals required for this experiment are reduced as the animals will be used for

both ectopic and orthotopic implantation models. As such, the estimated number of required animals can be reduced to ~48 (i.e. ~24 per implantation period).

Refinement

All animal procedures will be performed under full anaesthesia and the animals will be given painkillers pre- and post-surgery. Additionally, the well-being of the animals will be individually monitored by checking animal behaviour, body weight, and the wound area.

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

The animal procedures will be performed under full anaesthesia and the animals will be given painkillers pre- and post-surgery. Previous experiments using this implantation model have not shown any adverse effects or altered behaviour of the animals, for which it can be assumed that the model and measures to minimise adverse effects and animal discomfort are acceptable.

Repetition and Duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

☒ No

☐ Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Numerous previous animal experiments using this implantation model have shown negligible chances on adverse effects on animal welfare. Additionally, the number of drop-outs due to the proposed implantation models has shown to be negligible.

Explain why these effects may emerge.

Normal recovery from the surgery can be expected.

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

Animals will receive appropriate anesthesia and analgesia.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

Since no clinical effects are to be expected, apart from normal recovery of the surgery, the general humane endpoints apply:

Criteria for application of a humane endpoint are:

- 1) The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment
 - 2) The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the DEC
 - 3) (reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment
 - 4) The objective of the experiment has been reached
-

Indicate the likely incidence.

As numerous previous animal experimental work has utilised the proposed animal model (i.e. femoral condyle bone defect in rats) without any complications regarding (wound) infection or effect on animal behaviour, it is not expected that another humane endpoint than 'the objective of the experiment has been reached' will occur. As such, animals intended for implantation periods of 4 and 12 weeks will likely be sacrificed after completing their intended implantation period.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe).

Moderate

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

At the end of the implantation period(s), implantation sites need to be harvested for histological and histomorphometrical analysis.

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

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

☒ Yes



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.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert B.V.	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Effectiviteit en Veiligheid

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.

Dit experiment zal tweeledig opgezet worden en derhalve zal voor elk deel de primaire uitkomst parameter verschillend zijn. Er is een kortlopende deel waarin virale replicatie zal worden gemeten als parameter voor veiligheid en een langlopende deel waarin naar de klinische verschijnselen als parameter voor effectiviteit gekeken zal worden. In eerste instantie zullen alle dieren binnen 1 groep eenzelfde behandeling ondergaan, echter zal de looptijd van de studie verschillend zijn voor verschillende dieren binnen deze groep. Per virus zullen vier doseringen van de behandeling meegenomen worden in beide experimenten.

Eerdere experimenten uitgevoerd door de opdrachtgever hebben aangetoond dat de hoogste dosering (20 mg/kg intraveneus) bescherming biedt tegen infectie en ziekte. Indien het fenomeen van ADE (antibody dependent enhancement) aanwezig is zal de verwachting zijn dat één of meerdere lage doseringen (welke suboptimaal de infectie kunnen neutraliseren) geassocieerd zullen zijn met verergering van ziekte (ADE). Daarnaast wordt in deze studie ook gekeken naar de effectiviteit van het preparaat (met name of lagere concentraties van het antilichaam ook bescherming kunnen bieden en dus gedacht kan worden aan dose-sparing). Vandaar dat de volgende aflopende reeks van concentraties uitgetest zal worden:

20 mg/kg, 2 mg/kg, 0.2 mg/kg en 0.02 mg/kg.

Gestart wordt met 30 dieren per groep waarbij in de tijd wordt opgesplitst in 2 delen: deel 1 veiligheid (n=10) en deel 2 effectiviteit (n=20).

Aangezien het hier een tweeledige studie betreft naar zowel effectiviteit en veiligheid, maar van tevoren niet bekend is welke doseringen dit zullen zijn zal zowel in de hoge als de lage regionen twee doseringen meegenomen worden. Ter controle zal voor beide virussen een niet specifieke antilichaam preparaat (isotype controle) meegenomen worden in de hoogste en laagste dosering. Deze isotype controle zal dienen als negatieve controle op het toedienen van een preparaat na infectie.

Deel 1: Veiligheid

n=10 per behandelingsgroep zal op de piek van de virus replicatie (zoals bepaald in experiment 1 "Time Course") uit de studie worden gehaald en bij deze dieren zal de primaire uitkomst parameter virale load in longen zijn: verhoging in het geval van antilichaam afhankelijke verergering van ziektebeeld (ADE: antibody dependent enhancement) in vergelijking met dieren behandeld met het isotype controle preparaat. Het tijdstip van de piek van de virale load zal in beide gevallen gelijk zijn aan de piek die gevonden is in de Time Course.

Deel 2: effectiviteit

De resterende dieren van elke groep (n=20) zullen vervolgd worden gedurende 14 dagen waarbij de dagelijkse klinische score de primaire uitkomstparameter zal zijn.

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.

Dieren zullen op dag 0 intranasaal geïnfecteerd worden met ofwel muis-geadapteerd H1N1 ofwel muis-geadapteerd H3N2 influenza virus. Deze route is normaal ook de port-d'entree voor dit virus. Vervolgens zullen de dieren intraveneus behandeld worden met verschillende concentraties van het antilichaam preparaat of een isotype controle. Op dag X (zoals bepaald in experiment 1 "Time Course") zal een gedeelte van de dieren (n=5) binnen 1 groep geëuthanaseerd worden voor het bepalen van de virale load. De overige dieren (n=20) zullen elke dag geobserveerd worden tot en met dag 14 na infectie, klinische score genoteerd worden en lichaamsgewicht gemeten worden. Op basis van het bereiken van het humane eindpunt zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald.

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

In de voorbereidende experimenten (niet gekoppeld aan dit projectvoorstel) en experiment 1 "Time Course" zal onderzocht worden wat de optimale virale dosis is voor challenge en de optimale dag voor de piek van de replicatie. Resultaten in deze experimenten zullen als basis dienen voor het bepalen van de groepsgrootte van de dieren in Dierproef 2 "Effectiviteit en Veiligheid (ADE)".

Geschat aantal: 360 dieren en dit aantal is gebaseerd op de volgende aannames:

Kortlopende deel (veiligheid) : Aangezien dit het eerste experiment in de muis is dat onderzoek doet naar ADE (verhoging virale load en/of verhoging van pathologie) is het moeilijk/onmogelijk om in te schatten waarmee de ADE gecorreleerd is (maw welke mate van verhoging van 1 of beide parameters) en wat de verwachte standaard deviatie is van deze waarnemingen. Hierbij is de hypothese dat elke verhoging van virale load ten opzichte van de controle groep wordt geïnterpreteerd als ADE. Deze proef is niet eerder uitgevoerd, derhalve is het niet mogelijk om met behulp van een power berekening het aantal te bepalen en is de inschatting gemaakt hoeveel dieren er nodig zouden zijn om te komen tot significante verschillen (n=10). Mocht er binnen dierproef #1 wel een aanwijzing gevonden worden wat betreft spreiding tussen de groepen (een parameter die wel bepaald kan worden in tegenstelling tot het effect van ADE welke mogelijk als resultaat van dierproef #2 uit zal komen) zal dit meegenomen worden in een herziene groepsgrootte bepaling op basis van een adequate poweranalyse.

Langlopend deel (effectiviteit) In het langlopende deel van de studie zal de primaire uitleesparameter de klinische observaties zijn aan de hand van de scoringstabel en de groepsgrootte is bepaald met behulp van de Fischer's exact test. Indien een schatting wordt gedaan van het behandelingseffect in de behandelde groepen van 50% (dieren die score 2 of minder hebben) ten opzichte van de controle groep en 1 outlier binnen de controle groep (= een dier in de controle groep dat niet ziek wordt zijnde 5.5%) kan met een power berekening (alpha van 5% en power van 80%) bepaald worden dat er een minimale groepsgrootte nodig is van n=20 om tot significante verschillen te komen (zie onderstaande tabel). Totaal aantal van 240 dieren.

Behandeling	Controle	N
70%	0%	8
60%	0%	10
50%	0%	12
70%	8.3%	12
60%	6.6%	15
50%	5.5%	20

De resulterende Kaplan-Meier curves welke gegenereerd kunnen worden uit de resultaten van het langlopende deel (effectiviteit) zullen gebruikt worden om te bepalen of er significante verschillen zijn tussen de verschillende behandelingen en de isotype controle groepen.

B. De dieren

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

Diersoort: vrouwelijke CD-1 muizen.

Experiment 2 zal gericht zijn op het wel of niet induceren van ADE. Voor de bestudering hiervan dient een muizenstam gebruikt te worden met een compleet immuunsysteem, aangezien het immuunsysteem een grote rol speelt in het proces van ADE. Voor de studie naar ADE dient een zo wild-type mogelijk immuunsysteem beschikbaar te zijn. In het algemeen kunnen inteelt muizenstammen vanwege hun inteelt-karakter deficiënt zijn op 1 of meerdere vlakken van het immuunsysteem en derhalve minder geschikt om een dergelijk complex systeem als het immuunsysteem te bestuderen (het is nog steeds niet volledig bekend welke deficiënties een invloed hebben op zowel het aspecifieke als adaptieve deel van het immuunsysteem). Outbred muizen daarentegen kunnen worden gezien als immuuncompetente muizen en zijn dan ook beter geschikt om dit soort experimenten uit te voeren. Daarnaast zijn in de literatuur meerdere studies beschreven voor andere virale infecties met onder andere Dengue virus en Ebola virus (Puerta-Guardo et al Journal of Virology 2013) en daarnaast is deze muizenstam ook gebruikt voor het genereren en uittesten van muis-geadapteerd influenza virus (Brown PNAS 2001). In deze experimenten zal gebruik gemaakt worden van vrouwelijke muizen om agressie binnen de groepen tot een minimum te beperken.

Herkomst: geregistreerde fokker in de EU

Levensstadium: 6-8 weken oud bij start van het experiment

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.

Vervanging: deze dierproef is opgezet om de effectiviteit en veiligheid te bestuderen bij infectie met twee muis-geadapteerde influenza virussen. Een dergelijke studie is niet mogelijk in een in vitro model en derhalve is het niet mogelijk om dit in vitro uit te voeren. Wat betreft effectiviteit is het wel in vitro te meten of een bepaald antilichaam preparaat een neutraliserende werking heeft, maar voor het bestuderen van antilichaam afhankelijke verergering en werkzaamheid in vivo is een compleet immuunsysteem nodig en dit is niet na te bootsen in vitro.

Vermindering: Tijdens de studie zullen zo veel mogelijk parameters beoordeeld worden in deze studie (virologie, pathologie en klinische observaties), zodat zoveel mogelijk waarnemingen in één dier verkregen worden.

Verfijning: Meest invasieve handelingen (intranasale infectie en euthanasie) zullen uitgevoerd worden onder sedatie (isofluraan 3% / O2). Daarnaast zullen de dieren dagelijks gewogen worden. Deze observaties worden geïntensiveerd naarmate de klinische verschijnselen toenemen. Daarnaast zal een gedeelte van de

dieren (n=10 per groep) vroegtijdig uit de studie gehaald worden (op basis van de resultaten van experiment 1 "Time Course"). Ondanks het feit dat op dit tijdstip de virale load in de longen het hoogst zal zijn, zullen de klinische verschijnselen zich pas later manifesteren. Deze werkwijze zorgt ervoor dat de dieren in het kortlopende experiment geen ongerief zullen ondergaan.

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.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat dieren gehuisvest zullen worden in HEPA gefilterde IVC bakken, handelingen uitgevoerd zullen worden in een veiligheidskabinet en afval (bedding, kadavers en andere materialen gebruikt in de studie) aangeboden zal worden voor destructie. De gehele studie wordt uitgevoerd onder BSL II ingeperkte condities.

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.

Met behulp van literatuur studie is gekeken of eerdere experimenten uitgevoerd zijn, waarin een dergelijke vraagstelling is bestudeerd. In de literatuur zijn meerdere studies beschreven waarin gekeken naar ADE, echter dit was in het kader van andere virale infecties dan influenza. Daarnaast betreft het hier een studie die vanuit regulatorisch oogpunt uitgevoerd dient te worden voordat het hier uit te testen antilichaam preparaat in een klinische studie uitgetest kan worden.

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 > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. kortademigheid en gewichtsverlies
2. Eventuele verwondingen door agressie binnen de groep. De kans hierop is klein, maar kan nooit uitgesloten worden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Longontsteking door infectie met influenza
2. Gebruik van dieren die voorheen niet samen gehuisvest waren.

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

1. In het algemeen hebben analgetica (NSAID, aspirine of paracetamol) een onstekingsremmende werking en dergelijke bijverschijnselen zijn niet verenigbaar met het uitvoeren van infectie experimenten waarbij ook het immuunsysteem (wat betreft effectiviteit en veiligheid) deel uitmaakt van het proces.
2. Dieren zullen zover mogelijk besteld worden uit een grote batch die bij de fokker al in 1 groep gehuisvest waren. Daarnaast zullen de experimenten uitgevoerd worden met vrouwelijke dieren, aangezien agressie onderling minder aannemelijk is dan bij groepshuisvesting van mannelijke dieren.

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.

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden op de volgende criteria en bij matig (klinische score 3: kort lopende experiment) of ernstig ongerief (klinische score 4: lang lopende experiment) uit de proef worden gehaald door middel van euthanasie:

- 0. Geen klinische verschijnselen (geen ongerief)
- 1. Ruwe vacht (gering ongerief)
- 2. Ruwe vacht, verminderd alert, passief bij handelingen (gering ongerief)
- 3. Ruwe vacht, ineengedoken, bemoeilijkte ademhaling, passief bij handelingen (matig ongerief)
- 4. Ruwe vacht, ineengedoken, bemoeilijkte ademhaling, lethargisch (ernstig ongerief).

Een humane eindpuntsscore van 4 komt overeen met ernstig ongerief. Daarnaast zullen de observaties geïntensiveerd worden bij humane eindpuntsscore 3 van 1x per 24 uur naar minimaal 1x per 12 uur. Dit geïntensiveerd protocol zorgt ervoor dat dieren nooit langer dan 12 uur het maximale ongerief zullen ondergaan. Daarnaast zullen de dieren uit de proef gehaald worden als de dieren niet meer zelfstandig water en/of voer tot zich kunnen nemen.

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

Voor de dieren die vroegtijdig uit de studie gehaald worden voor het bepalen van de virale load op dag X zal de kans op het ontstaan van matig of hoger ongerief (score 3 en 4) niet aanwezig zijn en derhalve wordt het ongerief vantevoren ingeschat op gering (score 1 of 2) voor 100% van de dieren. Voor de dieren die de volledige looptijd van de studie doorlopen (14 dagen) kan er ernstig ongerief optreden als gevolg van afwezigheid van effectiviteit met inschatting van gering in 17% van de dieren (hoogst gedoseerde groepen), ernstig in 50% van de dieren (laagst gedoseerde groepen en controle groepen) en matig in de resterende 33% van de dieren.

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.

Op basis van de hierboven beschreven negatieve effecten zal het cumulatieve ongerief ingeschaald worden op gering (klinische score 1 of 2) voor het kortlopende experiment en ernstig (klinische score 4) voor het langlopende experiment.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Dieren zullen worden gedood om vervolgens de virale load in de longen te bepalen. Deze bepaling is niet mogelijk bij het in leven blijven van de dieren. De dieren die de volledige looptijd doorlopen zullen geëuthanaseerd worden om met behulp van (immuno)histochemie te kijken naar de pathologie in de longen.

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



30 JUN 2015

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 90500 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>BioXpert B.V.</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td></td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>54838134</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Nistelrooise Baan 3</td></tr><tr><td>Postbus</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>5374RE Schaijk</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL72RABO0183605888</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>BioXpert BV</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	BioXpert B.V.	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde		KvK-nummer	54838134	Straat en huisnummer	Nistelrooise Baan 3	Postbus		Postcode en plaats	5374RE Schaijk	IBAN	NL72RABO0183605888	Tenaamstelling van het rekeningnummer	BioXpert BV
Naam instelling of organisatie	BioXpert B.V.																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde																		
KvK-nummer	54838134																	
Straat en huisnummer	Nistelrooise Baan 3																	
Postbus																		
Postcode en plaats	5374RE Schaijk																	
IBAN	NL72RABO0183605888																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	BioXpert BV																	
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>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 7 - 2015
- Einddatum 1 - 7 - 2017
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de werkzaamheid en veiligheid van een medicijn tegen infectie met influenza virus in muizen.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC Stichting DEC consult
- Postadres
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 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

Plaats

Schaijk

Datum

25 - 6 - 2015

Handtekening



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV



Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD905002015121

Datum 01-07-2015

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw 

Op 25 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen. met aanvraagnummer AVD905002015121. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Wanneer een beslissing

Wij nemen uiterlijk 20 augustus 2015 een beslissing. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. 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).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Gesproken met DEC en onderzoeker (indien geel gearceerd komt het antwoord van de onderzoeker)

Datum: 30 juni 2015

Over het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121 hebben wij enkele vragen.

Zowel in Beschrijving Dierproeven 1 als 2 staat onder B uitleg over Experiment 2. Is dit de DEC opgevallen, of is de DEC van mening dat één van de teksten over dierproef 1 gaat?

→ Dierproef 1 is een vooronderzoek voor Dierproef 2. Daarom zijn voor beide proeven dezelfde dieren nodig en staat bij Dierproef 1 beschreven wat er bij Dierproef 2 (ook) nodig is.

Beide experimenten wil men uitvoeren met enkel vrouwelijke muizen, om agressie te voorkomen. Heeft de DEC hierbij stilgestaan? De CCD staat gebruik van één van beide geslachten alleen toe als dit goed is onderbouwd. De CCD heeft eerder dergelijke onderbouwingen als onvoldoende bestempeld.

→ Een (stabiele) groep mannen kan in de loop van de proef toch gaan vechten. Door veranderingen in de conditie van de dieren (ze worden ziek in dit geval), vinden er opnieuw hiërarchische vechtpartijen plaats. Er moet dan besloten worden of alle groepen uit elkaar gehaald worden, of alleen de vechtende groep. Om deze extra variabele uit te sluiten, is gekozen voor alleen vrouwelijke muizen.

In beide dierproeven wordt gesproken over 'gering ongerief'. Dit is een term uit de oude wetgeving. Heeft de DEC dit opgemerkt, en hoe heeft de DEC dit naar de huidige wetgeving geïnterpreteerd?

→ De DEC heeft dit als 'licht ongericht' geïnterpreteerd

Bij Dierproef 1 worden dieren geëuthanaseerd als zij 'matig ongerief' ondervinden. Heeft de DEC hierbij stilgestaan? Is de DEC van mening dat de term 'matig' overeenkomt met de huidige wetgeving, of een andere indeling? Wij zijn van mening dat matig ongerief

→ De term 'matig' komt overeen met de huidige wetgeving. Als de dieren uit Proef 1 matig ongerief ondergaan als gevolg van de infectie, wordt dit gezien als humaan eindpunt.
→ Het matig ongerief komt niet voort uit de handelingen binnen de proef. Onvoorzien zou het wel kunnen, dan wordt er geëuthanaseerd. Het is niet de verwachting dat dieren matig ongerief krijgen.

Het aantal dieren in Dierproef 2 is niet heel helder beschreven. Kon de DEC de berekening van de aanvrager volgen?

→ 30 dieren per groep x 12 groepen.
groepen: er zijn 4 doseringen x 2 virussen = 8 groepen
controlegroep per virus voor hoogste en laagste dosis (= 2 virussen x 2 doses) = 4 groepen

Er is geen specifieke reden om voor een bepaald geslacht te kiezen in deze experimenten, echter het kiezen van een bepaald geslacht heeft een aantal consequenties op het verloop van de studie met betrekking tot:

- Bruikbaarheid van gegevens in voorbereidende studies: in deze studies is de infectie dosis bepaald van de twee benoemde influenza virussen in vrouwelijke muizen. Voor extrapolatie van de gegevens van deze studies naar het huidige projectvoorstel is het noodzakelijk om in het hoofdexperiment ook gebruik te maken van vrouwelijke dieren. Voorbereidend werk in een ander geslacht dan de hoofdstudie zou kunnen betekenen dat de gevonden dosis in het voorbereidend werk niet leidt tot bruikbare resultaten in de studies beschreven in het huidige projectvoorstel.

Deze dieren worden verkregen van een commerciële leverancier en de aantallen zullen niet leiden tot opvoeren van de fok. Derhalve zal het gebruik van dit relatief kleine aantal dieren niet leiden tot meer surplus mannelijke dieren.

████████████████████

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: vrijdag 3 juli 2015 11:56
To: [REDACTED]
Subject: Vraag AVD905002015121

Geachte meneer ████████,

Over het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121 hebben wij een vraag.

In uw aanvraag geeft u aan alleen vrouwelijke muizen te willen gebruiken. De CCD stuurt actief op het voorkomen van in voorraad gedode dieren. Kunt u aantonen dat het aldus gecreëerde aantal surplusdieren van het andere geslacht niet in voorraad gedood zal worden? Als u dit inderdaad kan aantonen vragen wij u dit te beargumenteren.

Om uw aanvraag in de volgende vergadering te kunnen bespreken, vraag ik u uiterlijk woensdag 8 juli te antwoorden.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,
Centrale Commissie Dierproeven



www.centralecommissiedierproeven.nl

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



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3
5374RE SCHAIJK

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015121

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 13 juli 2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 25 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 30 juni 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. Overige vragen zijn beantwoord door de onderzoeker.

Beslissing

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

U kunt met uw project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 13 juli 2015 tot en met 1 juli 2017.

Omdat het hier de afronding van een project betreft, gaat de CCD akkoord met het gebruik van enkel vrouwelijke dieren. Een nieuw project zal met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd moeten worden.

Beoordeling achteraf

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

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-Consult 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 het 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- en regelgeving liggen ten grondslag aan 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 gegevens in het colofon.

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

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

Meer informatie

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

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: - DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: BioXpert B.V.
Adres: Nistelrooise Baan 3
Postcode en woonplaats: 5374RE SCHAIJK
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 juli 2015 tot en met 1 juli 2017, voor het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Consult.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, waarvan het ondertekende exemplaar is ontvangen op 30 juni 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 26 juni 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 26 juni 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 25 juni 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Time Course	Muizen	120	Licht
Effectiviteit en Veiligheid	Muizen	360	33% Licht 66 % Ernstig

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2017 plaatsvinden.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2017 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 30 juni 2015 13:04
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Vragen AVD905002015121

Geachte meneer, mevrouw,

Over het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121 hebben wij enkele vragen.

Zowel in Beschrijving Dierproeven 1 als 2 staat onder B uitleg over Experiment 2. Is dit de DEC opgevallen, of is de DEC van mening dat één van de teksten over dierproef 1 gaat?

Beide experimenten wil men uitvoeren met enkel vrouwelijke muizen, om agressie te voorkomen. Heeft de DEC hierbij stilgestaan? De CCD staat gebruik van één van beide geslachten alleen toe als dit goed is onderbouwd. De CCD heeft eerder dergelijke onderbouwingen als onvoldoende bestempeld.

In beide dierproeven wordt gesproken over 'gering ongerief'. Dit is een term uit de oude wetgeving. Heeft de DEC dit opgemerkt, en hoe heeft de DEC dit naar de huidige wetgeving geïnterpreteerd?

Bij Dierproef 1 worden dieren geëuthanaseerd als zij 'matig ongerief' ondervinden. Heeft de DEC hierbij stilgestaan? Is de DEC van mening dat de term 'matig' overeenkomt met de huidige wetgeving, of een andere indeling? Wij zijn van mening dat matig ongerief

Het aantal dieren in Dierproef 2 is niet heel helder beschreven. Kon de DEC de berekening van de aanvrager volgen?

Omdat de CCD deze aanvraag graag in de volgende vergadering wil beoordelen, vraag ik u vandaag een reactie te sturen. Voor vragen die u niet kunt beantwoorden, zal ik contact opnemen met de onderzoeker.

Ik heb geprobeerd u zojuist te bellen, maar kreeg u helaas niet te pakken. Ik zal later vandaag nogmaals proberen te bellen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 30 juni 2015 14:58
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Vragen AVD905002015121

Geachte meneer, mevrouw,

Telefonisch hebben wij contact gehad over enkele vragen betreffende het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121.

Er zijn twee vragen die ik aan de onderzoeker gesteld heb, hij ontvangt een cc van dit bericht. Zoals afgesproken een terugkoppeling van de antwoorden.

Zowel in Beschrijving Dierproeven 1 als 2 staat onder B uitleg over Experiment 2.

Dierproef 1 is een vooronderzoek voor Dierproef 2. Daarom zijn voor beide proeven dezelfde dieren nodig en staat bij Dierproef 1 beschreven wat er bij Dierproef 2 (ook) nodig is.

Het aantal dieren in Dierproef 2 is niet heel helder beschreven.

Het gaat in totaal om 360 dieren.

Er zijn 30 dieren per groep, waarbij 10 dieren voor deel 1 en 20 dieren voor deel 2 gebruikt worden.

Er zijn 12 groepen: 4 doseringen x 2 virussen = 8 groepen

controlegroep: 2 virussen x 2 doses (hoogste en laagste dosis) = 4 groepen

$8 + 4 = 12$ groepen

$12 \text{ groepen} \times 30 \text{ dieren} = 360 \text{ dieren}$

Hiermee zijn de vragen beantwoord.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 17 juli 2015 9:48
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Terugkoppeling AVD905002015121

Geachte DEC Consult,

U heeft advies uitgebracht over het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. Omdat het hier de afronding van een project betreft, gaat de CCD akkoord met het gebruik van enkel vrouwelijke dieren. Een nieuw project zal met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd moeten worden.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

0900 – 28 000 28 (10 ct/min)