

	Inventaris Wob-verzoek W15-11								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS 2015124								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking				x		x	x	
12	Vergunning			x					
13	Mail CCD-nummer 1-6-2015				x		x	x	
14	Mail aanvullende info 24-7-2015				x		x	x	
15	Brief aanvullende info				x		x	x	
16	Antwoord op vraag CCD				x		x	x	
17	Mail aanpassen NTS 18-8-2015				x		x	x	
18	Aanpassing NTS				x		x	x	
19	Mail besluit 20-8-2015				x		x	x	
20	Mail terugkoppeling DEC 20-8-2015				x		x	x	



15 JUL 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 border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td><td style="width: 50%;">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 border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td><td style="width: 50%; text-align: right;">☑ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</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 border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td><td style="width: 50%; text-align: right;">☑ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</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 - 6 - 2015
- Einddatum 31 - 5 - 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Testen van anti-rabies behandelings strategieën 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.

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- ☐ Melding Machtiging
- ☐

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

1 - 7 - 2015

Handtekening



BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3

5374 RE Schaijk

The Netherlands

T: +31 (0) 486-463303

F: +31 (0) 486-463498

info@bioxpert.nl

www.bioxpert.nl

Aan: Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Datum: 14 juli 2015

Betreft: Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD905002015124

Geachte heer / mevrouw,

Bijgaand de getekende aanvraag Projectvergunning Dierproeven AVD905002015124 met als titel:

Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.

Deze aanvraag is vandaag met de beveiligde e-mailverbinding ingediend.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]



Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- ☒ Basic research
- ☒ Translational or applied research
- ☒ Regulatory use or routine production
- ☐ Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- ☐ Higher education or training
- ☐ Forensic enquiries

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

In the context of vaccine and antiviral compound (hereafter referred to as “antiviral intervention strategies”) development, Viroclinics Biosciences offers preclinical models in which these development strategies can be tested in relevant *in vivo* settings. For rabies virus infections, preclinical models are available in mice. These models can be used to assess the characteristics of a multitude of antiviral intervention strategies, such as (monoclonal) antibody preparations, antiviral pharmaceutical substances (compounds), vaccines, or a combination thereof.

Rabies is a fatal viral disease that can be transmitted to humans through bites by infected animals, in most cases domestic dogs. The development of human rabies after such transmission incidents can be prevented by prompt administration of post-exposure prophylaxis (PEP), which is a combination of an inactivated rabies vaccine and anti-rabies immunoglobulin preparation. PEP and mass vaccination of domestic dogs has resulted in control of the disease in industrialized countries. Both vaccine, which is also used prophylactically in target groups, and PEP, however, are costly instruments which impede their use in developing countries, areas that are the most affected (WHO, 2010). Therefore, the problem is not that prophylactic treatments are not available, the problem lies in the costs of global implementation. This is partly caused by the fact that the vaccine is poorly immunogenic and therefore requires at least three immunizations and yearly booster vaccinations in order to remain effective. PEP also includes multiple shots of antibody preparations for which inefficient production processes, potential safety issues and limited availability impede global implementation (WHO, 2010).

Newly developed vaccines are aimed at improved immunogenicity, dose sparing (e.g. through the use of adjuvants), new presentation or formulation methods and reduced production costs. Newly developed antibody preparations are aimed at improved efficacy, either through the development of new antibodies or new and more efficient ways to present and/or formulate existing antibodies with proven effectiveness.

Apart from PEP, which is only efficacious when administered promptly after exposure, there is no therapeutic treatment against rabies disease available. If left untreated, once clinical symptoms arise the infection is 100% fatal. In the absence of any treatment against rabies, any molecule with the potential to improve the clinical course of disease and/or improve survival rates would be a significant improvement in the battle against rabies.

These new antiviral compounds, new or improved antibody or vaccine preparations, could help further decrease the global impact of rabies infection and disease and thereby potentially fulfill an unmet need.

This project proposal covers the use of the above mentioned models to test the pharmacokinetics, immunogenicity and/or efficacy of newly developed antiviral intervention strategies against rabies virus infections in mice. These newly developed products are provided to the applicant by developers of these

products (such as pharmaceutical companies) who want to test these new products in a preclinical model for rabies.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The studies described in this project proposal allow testing of newly developed biological and/or pharmaceutical products with regards to their pharmacokinetics, immunogenicity and/or efficacy to protect against rabies virus infections or to improve clinical outcome of disease.

The specific needs to which preclinical testing of newly developed anti-rabies products respond to are the following:

Testing of vaccines that have improved immunogenicity and efficacy and/or lower production costs compared to the currently available vaccine preparations that are used for both pre- and post-exposure prophylaxis.

Testing of antibody preparations that have improved efficacy, lower production costs or less adverse effects compared to the currently available antibody preparations that are used for PEP and may have potential for use in pre-exposure settings.

Testing of antiviral compounds that improve PEP treatment

Testing of antiviral compounds that improve the outcome of clinical disease caused by rabies infections as currently no therapeutic product is available

3.3 Relevance

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

Rabies virus infection is one of the most ancient known and most devastating diseases to date. If left untreated, it is known to kill 100% of the affected persons. Transmission to humans mainly through bites by infected animals, mostly dogs (WHO, 2013). If pre- or post exposure prophylaxis is not given to exposed humans, the virus will migrate slowly to the central nervous system to cause an inevitable excruciating death. The disease is preventable through administration of post-exposure prophylaxis (PEP) to exposed subjects and additional control measures include mass vaccination of dogs. Still, it has a large impact on populations with limited access to health care. It has been reported that globally, canine rabies causes approximately 59,000 (95% Confidence Intervals: 25-159,000; mortality metric) human deaths, over 3.7 million (95% CIs: 1.6-10.4 million) disability-adjusted life years (DALYs; a combined mortality and morbidity metric) and 8.6 billion USD (95% CIs: 2.9-21.5 billion) economic losses annually (Hampson, PLoS Negl Trop Dis., 2015). Based on marketing information of suppliers of PEP, it is estimated that more than 15 million exposed subjects per year receive PEP. In another study it was estimated that without the availability of PEP, 327000 instead of 55000 people would succumb to rabies each year in Africa and Asia (Knobel, WHO, 2005). Although prophylactic products are available and PEP, if administered soon enough, can prevent development of rabies disease in exposed subjects, there is an unmet need for vaccines and antibody preparations with improved efficacy, reduced costs and higher global accessibility (WHO, 2010).

Another reason for this devastating statistics is that no specific or supporting treatment exists to overcome fatal outcome of infection.

Studies in this project proposal are aimed to aid development of both antiviral intervention strategies but also of strategies with the potential to improve the clinical outcome of disease by offering a relevant preclinical model to test the capacity of these newly developed products to act as prophylactic and/or therapeutic treatment against rabies virus infection and disease.

3.4 Research strategy

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

A typical antiviral intervention strategy development programme consists of different study phases. These phases are represented by the modular structure of this project proposal. These modules include (pilot) dose finding of challenge virus strains (Module 1), pharmacokinetics of antiviral compounds (Module 2), immunogenicity of candidate vaccines (Module 3), and efficacy of these vaccines and compounds (Module 4). Which modules are to be used to test a specific product is dependent on extent of information that is available for the product under study itself and the virus strain and infection route to be used.

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

Module 1: Rabies virus dose-finding in mice

Stage 1. Pilot dose finding

This stage serves to establish the virus dose to be used in dose finding studies (stage 2).

The types of animal procedures are: intramuscular, intranasal or intracranial infection with rabies, daily weighing, and daily scoring of clinical signs.

Stage 2. Dose finding

This stage is used to determine the viral dose to be used in the efficacy module (4).

The types of animal procedures are: intramuscular, intranasal or intracranial infection with rabies, daily weighing, daily scoring of clinical signs.

Module 2: Determination of the pharmacokinetics of rabies virus specific antiviral products in mice

This module serves to establish the pharmacokinetics of antiviral compounds (e.g. pharmaceutical compounds, antibody preparations) that will determine dosing and frequency of these compounds in the efficacy module.

The types of animal procedures are: Sampling of blood, administration of antiviral compounds [i.c. (intra-cranial), i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested].

Module 3: Determination of the immunogenicity of rabies virus specific antiviral products in mice

This module serves to establish the immunogenicity (vaccine dose, vaccination scheme) of anti-rabies vaccines that will be used in the efficacy module.

The types of animal procedures are: sampling of blood, administration of vaccines (i.c., i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested).

Module 4: Determination of the prophylactic and/or therapeutic efficacy of rabies virus specific antiviral products in mice

This module serves to determine the prophylactic and/or therapeutic efficacy of antiviral compounds (e.g. pharmaceutical compounds, antibody preparations) or vaccines).

Animal procedures for testing the efficacy of a therapeutic agent: intramuscular, intranasal or intracranial infection with rabies, daily weighing, daily scoring of clinical signs, administration of vaccines (i.c., i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested), blood sampling.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

Module 1: Rabies virus dose-finding in mice

The pilot dose finding stage (module 1, stage 1) serves in case of a new/unknown virus strain and/or infection route for that particular model of infection to determine the range of virus titres to be used in dose finding studies (module 1, stage 2). Stage 2 serves to determine the virus titre to be used in

efficacy studies (Module 4, see below) in case of new/ unknown virus strains under study.

Module 2: Determination of the pharmacokinetics of rabies virus specific antiviral products in mice

Pharmacokinetic studies serve to determine the compound dose and administration frequency to be used in efficacy studies (module 4).

Module 3: Determination of the immunogenicity of rabies virus specific antiviral products in mice

The immunogenicity of vaccines is determined in module 3 and serves to determine the vaccine dose administration frequency to be used in the efficacy study (module 4).

Module 4: Determination of the prophylactic and/or therapeutic efficacy of rabies virus specific antiviral products in mice

In the efficacy study (prophylactic and/or therapeutic), the prophylactic and/or therapeutic efficacy of antiviral compounds or vaccines are tested, using the results of modules 1, 2 and/or 3 when applicable.

Depending on what is known about the challenge viruses and/or infection route, the antiviral compounds or the vaccines to be tested in the studies within the project proposal, not all individual modules may be required to be included in the final study.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Module 1: Rabies virus dose-finding in mice
2	Module 2: Determination of the pharmacokinetics of rabies virus specific antiviral products in mice
3	Module 3: Determination of the immunogenicity of rabies virus specific antiviral products in mice
4	Module 4: Determination of the prophylactic and/or therapeutic efficacy of rabies virus specific antiviral products in mice
5	
6	
7	
8	
9	
10	



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'.	90500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	BioXpert BV	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Module 1: Rabies virus dose-finding in mice

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The animal procedures in this part of the project proposal are designed to determine the optimal rabies virus infectious dose for a particular route of challenge infection for which this dose has not been determined yet. This can be the case for new or untested rabies virus strains or when a virus is to be used via an inoculation route for which no optimal infectious dose has been determined yet.

Protection against rabies by vaccination or antiviral compounds can act through various mechanisms, which drives the choice of the challenge model (virus strain, route of challenge infection). Since it remains unclear how exactly the virus is transmitted from the site of infection to the central nervous system and how long this transport takes, demonstration of efficacy against replication in the central nervous system may require the use of intracranial (i.c.) challenge models. Also, in cases where virus strains are to be used for which no robust peripheral (i.m.) challenge dose is available that accommodates use of survival as a primary readout parameter, an i.c. challenge is required. Although primary i.c. infection in field situations has never been reported, the i.c. challenge is a valuable asset of the mouse/rabies model that allows efficacy assessment of anti-rabies intervention strategies. In cases where experiments are performed that will be used for registration purposes of newly developed vaccines, use of an i.c. challenge model may be required (FDA and Ph. Eur regulations).

The administration route of a virus for a particular study within the project also depends on the nature of the product(s) to be tested and the challenge model in which they are to be tested (in Module 4). In cases where the product exerts its antiviral function in the brain (either directly (e.g. an antiviral preparation that can cross the blood brain barrier) or indirectly (e.g. a vaccine preparation) via induced immune responses), the administration route of the virus preparation can be the intracranial (i.c.) or intranasal (i.n.) route. In cases where the product exerts its function outside of the brain, a peripheral, i.e. intramuscular (i.m.), challenge will be used. Additionally, kinetics of the antiviral product to be tested in the experiments of Module 2 may influence the choice of the infection route, e.g. in the case of a RNA or DNA based product from which the effector molecule(s) need(s) to be expressed before it can exert its function, the challenge route can be intracranially or intranasally if the bioavailability is quick or intramuscular if bioavailability requires prolonged incubation after administration. Furthermore, when a product to be tested is to be applied intracranially, this may also drive the choice of the infection route.

Rabies virus infection is lethal. Infected animals will develop rabies disease manifested with neurological symptoms of paralysis and die as result of encephalitis. Typically, after peripheral inoculation with a lethal dose of rabies virus, mice will develop ruffled hair approximately 5-7 days post infection and within 2-4 days will further develop hind-leg paralysis and die as a result of infection. The clinical signs are scored using Phases, the features of which are described below.

Phase 1: Only ruffled hair: early sign of encephalitis, typically lasting 2-4 days.

Phase 2: Ruffled hair AND hunched back. Progression to rabies encephalitis.

Phase 3: Ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis.

The animals will be euthanized as soon as they reach Phase 3 (humane end point for euthanasia).

The primary outcome parameter in the described studies is survival.

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

The studies to be carried out within this part of the project consist of 2 stages, the animal procedures for each of these are listed below:

Stage 1. Pilot dose finding (to establish the virus dose to be used in dose finding stage)

Animal procedures:

Day 0: intramuscular, intranasal or intracranial infection with rabies; weighing

Day 0 – 21: daily weighing, daily scoring of clinical signs (Phase 1, 2 or 3 as described above). Scoring will be performed twice daily after the first signs of

disease (ruffled hair) appear. Animals will be euthanised as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). Surviving animals will be euthanised at the end of the study (not later than day 21).

Stage 2. Dose finding (based on results obtained in the Pilot dose finding stage; this module is used to establish the viral dose to be used in the Efficacy module)

Day 0: intramuscular, intranasal or intracranial infection with rabies; weighing

Day 0 – 21: daily weighing, daily scoring of clinical signs (Phase 1, 2 or 3 as described above). Scoring will be performed twice daily after the first signs of disease (ruffled hair) appear. Animals will be euthanised as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). Surviving animals will be euthanised at the end of the study (not later than day 21).

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

Calculation of number of animals per stage

Stage 1. Pilot dose finding stage (to establish the virus dose to be used in dose finding stage)

To determine the dose range to be tested in dose finding studies in stage 2, a limited number of mice (3 groups of 4 animals) will be infected with three different dosages (low, medium and high). Considering the pilot nature of the experiment, this can be performed with limited numbers of animals.

Stage 2. Dose finding stage (based on results obtained in the Pilot dose finding stage; this stage is used to establish the virus dose to be used in the Efficacy module)

From previously reported studies (Wunderli, *AJVR*, 2004) with different rabies strains a group size of 10 animals was found to result in statistically significant results to determine the challenge dose required to study efficacy of antivirals and vaccines (Module 4). For studies in this module, similar routes of inoculation and infection doses will be used for virus dose finding.

Based on the number of studies to be performed over a 5 year period, the maximum total number of animals to be used in this part of the project is 248. This maximum number of animals to be used is an estimate based on the expected number of studies to be performed, which is unclear, as the applicant performs these studies as a contract research organization for third parties. The actual number of studies that will be carried out depends on the number of contracts that are realized over the 5 year period for which the project proposal applies. The table below gives an expected breakdown of the number of animals required for this part of the 5 year project proposal.

Module	Stage	Group Size	Estimated Number of Groups/study	Estimated Number of Experiments in 5 years	Total Number of Animals/Module in 5 years
1	1	4	3	4	48
	2	10	5	4	200

Total: 248

B. The animals

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

Species: Mice

Justification: Mice are internationally recognized as a relevant (preclinical) animal model for rabies that not only allows research into disease mechanisms but also the testing of newly developed and/or improved prophylaxis or treatment regimens. Disease progression, transport in the brain and appropriate challenge virus doses have been the subject of thorough research in this model. Both outbred mice (e.g. CD-1, NMRI or Swiss) or inbred mice (e.g. BALB/c or C57BL/6) will be used. Because of group housing conditions, preferably female mice will be used.

Origin: Registered breeder/supplier in Europe

Estimated numbers: see Calculation of number of animals in section A.

Life stages: new-born to adult, depending on the virus strain (see section A, Experimental approach and primary outcome parameters), prophylactic or therapeutic regimen to be used for a particular study. Use of new-borns may be required in case a rabies virus strain is used that requires a more sensitive infection model than (young) adult mice, based on the fact that for diagnostic purposes the use of new-borns is described in the mouse inoculation test (OIE Terrestrial Manual, 2013).

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.

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

Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation, that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

The effect of antiviral compounds or vaccines on improvement of the clinical course of rabies infection and/or increasing survival rates after rabies virus infection can only be studied in vivo as no in vitro alternatives currently exist. Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

Reduction:

Statistical power analysis (see above) will be provided for each study to be performed under the project proposal to ensure statistically significant results using the minimum number of animals required. The provided power analysis is prospective. Based on the outcome of the first studies, the power analysis

may be refined in order to further minimize the number of animals to be used in subsequent studies in which optimal virus challenge doses are to be determined.

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

- 1) For infection and euthanasia procedures, the animals will be sedated using isoflurane anesthetic procedures. Also, the animals will be scored daily for the appearance of clinical signs based on the scoring system described above. Rabies virus infection is lethal when the virus reaches and starts to replicate in the brain. A clinical scoring system is deployed to prevent unnecessary discomfort to infected animals. When Phase 1 of the clinical scoring system is reached, the observation frequency will be increased to twice daily. As soon as animals enter Phase 3 (humane end point) of the clinical scoring system they will be killed.
- 2) All procedures involving rabies virus will be performed in DM-III equipment/facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

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.

n.a.

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.

Animal handling for infection purposes will be performed under anesthesia in order to limit discomfort and distress.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Rabies virus targets the central nervous system upon infection, causing tremor, paralysis (of the hind legs) and ultimately results in death if untreated.

Explain why these effects may emerge.

Untreated ongoing infection with rabies will result in virus replication in the central nervous system.

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

Humane endpoints have been determined to minimise animal suffering that might occur during these studies. The animals will be checked on a daily basis, a frequency that can be increased should specific clinical signs arise (see section J for details on clinical signs and humane endpoint definition)

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.

The animals will be checked daily for signs of disease and twice daily (every 12 hours) after the first signs of disease appear (i.e. ruffled hair). The animals will be euthanized by cervical dislocation under isoflurane anesthesia when they reach humane end points for euthanasia. The humane end points include ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis. In more detail, rabies encephalitis is expected to follow the course outlined below:

Phase 1: Only ruffled hair: early sign of encephalitis, lasting 2-4 days. From this point forward, animals will be checked every twelve hours for progression to rabies encephalitis.

Phase 2: Ruffled hair AND hunched back. Progression to rabies encephalitis.

Phase 3: Ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis: animals will be euthanized as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). Animals in disease phases up to 2 still have the possibility to experience a prolonged survival dependent on the (efficacy of the) treatment under study.

Indicate the likely incidence.

Depending on the model used up to 100% of animals in the highest dosage groups. Rabies virus challenge dosages will be selected so that the range of results will include groups that have survival rates below 50% and groups that have survival rates above 50%. Therefore, the likely incidence for all animals

is estimated to be 50%.

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').

Infection procedures, brief: moderate (i.m., i.n.), severe (i.c.)

Rabies virus infection and development of disease: moderate based on the application of humane endpoints.

Overall maximum severity is considered moderate based on the brevity of severe procedures and the application of humane endpoints

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.

Animals will be euthanized to collect blood and organs. Up to 100% of animals in a group may be killed due to a humane endpoint, depending on the challenge dosage used.

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.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'.	90500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	BioXpert BV	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		2	Module 2: Determination of the pharmacokinetics of rabies virus specific antiviral products in mice

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The animal procedures in this part of the project proposal are designed to determine the pharmacokinetics of antiviral compounds. The results of the studies in these modules may be used as input for design of the studies to be performed in Module 4 of the project, in which efficacy of treatment against rabies virus infection is assessed.

Primary outcome parameters depend on the product to be tested and can be virus specific antibody titers in serum in the case of antibody preparations or serum compound concentrations in the case of antiviral compounds. The results of the studies carried out in this part of the project will be used to determine the administration schedule of the tested products to be used for the efficacy studies that are described in Module 4 of the project proposal.

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

To establish the pharmacokinetics of antiviral compounds (e.g. pharmaceutical compounds, antibody preparations) that will determine dosing and frequency of these compounds in the Efficacy module described in Module 4), a typical study design would be the following:

Animal procedures:

14 days is considered to be the maximum testing period. For pharmaceutical compounds the period will most likely be shorter, for antibody preparations, at most, a 14 day period will be used.

Day 0: sampling of blood (reference sample, may also be taken before day 0), administration of antiviral compounds (i.c., i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested).

Day 0 – 14: Sampling of blood, the frequency depends on the product to be tested. Depending on the nature of the product, additional administration times may be required (e.g. if there are indications that a compounds half-life will be below a certain time period so that frequent administration is needed to maintain a certain minimally required level in circulation).

Day 14: euthanasia.

Blood sampling will be done via the facial vein (submandibular), individual sampling volumes will not exceed 100µl. Total blood sampling volume will not surpass 8 ml/kg/28 days (~0.3 ml). Maximum blood sampling frequency will be once every two days over a week.

Administration route justification:

Protection against rabies by vaccination or antiviral compounds can act through various mechanisms, which drives the choice of the challenge model (virus strain, route of challenge infection) and the administration route of the product to be tested. The administration route depends on the nature of the product(s) to be tested and the challenge model in which they are to be tested (in Module 4). In cases where the product exerts its antiviral function in the brain (either directly (e.g. an antiviral preparation that can cross the blood brain barrier), the administration route of the product can be the i.v., i.m., i.p. or s.c. An i.c. administration route may be required when a product to be tested needs to exert its function directly on infected neurons of infected animals in the efficacy studies of Module 4.

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

Calculation of number of animals

Because most formulations to be tested in this module will be tested for the first time in newly developed administration schemes, no power calculation for the size of the treatment or the control groups is performed. Data obtained in these studies will be used for power calculations for future experiments. Also, since the resolution of the readout parameter(s) is likely to differ between studies (these can be serum protein levels, ELISA values, virus neutralization titers, immunoglobulin levels, etc., depending on the product), future power analysis calculations will differ between studies. These will be provided upon submission of the final working protocol to the IvD. The *maximum* group size for the studies in this module is estimated to be 8.

Using statistical Power analysis tools, the number of animals required for each study will be calculated specifically for each study and provided to the IvD. Based on the number of studies to be performed over a 5 year period, the maximum total number of animals to be used in this part of the project is 96. This maximum number of animals to be used is an estimate based on the expected number of studies to be performed, which is unclear, as the applicant performs these studies as a contract research organization for third parties. The actual number of studies that will be carried out depends on the number of

contracts that are realized over the 5 year period for which the project proposal applies. The table below gives an expected breakdown of the number of animals required for this part of the 5 year project proposal.

Module	Group Size	Estimated Number of Groups	Estimated Number of Experiments in 5 years	Total Number of Animals/Module in 5 years
2	8	4	3	96

B. The animals

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

Species: Mice

Justification: Mice are internationally recognized as a relevant (preclinical) animal model for rabies that not only allows research into disease mechanisms but also the testing of newly developed and/or improved prophylaxis or treatment regimens. Disease progression, transport in the brain and appropriate challenge virus doses have been the subject of thorough research in this model. Both outbred mice (e.g. CD-1, NMRI or Swiss) or inbred mice (e.g. BALB/c or C57BL/6) will be used. Because of group housing conditions, preferably female mice will be used.

Origin: Registered breeder/supplier in Europe

Estimated numbers: see Calculation of number of animals.

Life stages: new born to adult, depending on the virus strain, prophylactic or therapeutic regimen to be used for a particular study. Use of new borns may be required in case a rabies virus strain is to be used in Modules 1 and/or 4 that requires a more sensitive infection model than (young) adult mice, based on the fact that for diagnostic purposes the use of new borns is described in the mouse inoculation test (OIE Terrestrial Manual, 2013).

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.

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

Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge

virus strains and their routes of inoculation, that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

The effect of antiviral compounds or vaccines on improvement of the clinical course of rabies infection and/or increasing survival rates after rabies virus infection can only be studied in vivo as no in vitro alternatives currently exist. Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

Reduction:

Statistical power analysis (see above) will be provided for each study to be performed under the project proposal to ensure statistically significant results using the minimum number of animals required. The provided power analysis is prospective. Based on the outcome of the first studies, the power analysis will be refined in order to further minimize the number of animals to be used in subsequent studies.

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

- 1) For administration, sampling and euthanasia procedures, the animals will be sedated using isoflurane anesthetic procedures.
- 2) All procedures will be performed using equipment and facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

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.

n.a.

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.

Animal handling for administration and sampling purposes will be performed under anesthesia in order to limit discomfort and distress.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

N.a.

Explain why these effects may emerge.

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

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.

Indicate the likely incidence.

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').

Administration procedures, brief: moderate (i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c), severe (i.c.)

Sampling procedures, brief: moderate

Overall maximum severity is considered 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.

Animals will be euthanized to collect blood.

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.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'.	90500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	BioXpert BV	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3	Type of animal procedure Module 3: Determination of the immunogenicity of rabies virus specific antiviral products in mice

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The animal procedures in this part of the project proposal are designed to determine the immunogenicity of rabies vaccine preparations. The results of the studies in these modules will be used as input for design of the studies to be performed in Module 4, in which efficacy of vaccine preparations against rabies virus infection is assessed.

Primary outcome parameters are antibody (e.g. virus neutralizing) titers in serum. The results of these studies will be used to determine the design (administration protocol, time of virus challenge) of the study in which the efficacy of the product under research will be assessed, in Module 4.

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

Animal procedures:

Day 0: sampling of blood (reference sample, may also be taken before day 0), administration of vaccines (i.c., i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested).

In case of a multiple shot vaccination scheme, administration of vaccines will be repeated on additional time points. Intervals between vaccinations can range from days to weeks, depending on the vaccine preparation to be tested, ranging from days to weeks.

In order to assess induced immune responses, post vaccination blood samples will be drawn. The sampling frequency (weekly-monthly) depends on the vaccine preparation to be tested. An immunogenicity study can range from weeks to months.

At the end of the study, the animals will be euthanized.

Blood sampling will be done via the facial vein (submandibular), individual sampling volumes will not exceed 100µl. Total blood sampling volume will not surpass 8 ml/kg/28 days (~0.3 ml). Maximum blood sampling frequency will be once per week.

Administration route justification:

Protection against rabies by vaccination or antiviral compounds can act through various mechanisms, which drives the choice of the challenge model (virus strain, route of challenge infection) and the administration route of the product to be tested. The administration route depends on the nature of the product(s) to be tested and the challenge model in which they are to be tested (in Module 4). In cases where the product exerts its antiviral function in the brain (either directly (e.g. an antiviral preparation that can cross the blood brain barrier), the administration route of the product can be the i.v., i.m., i.p. or s.c. An i.c. administration route may be required when a product to be tested needs to exert its function directly on infected neurons of infected animals in the efficacy studies of Module 4.

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

Calculation of number of animals

Immunogenicity module (to establish the immunogenicity (vaccine dose, vaccination scheme) of anti-rabies vaccines that will be used in the Efficacy module) Because most vaccines formulations will be tested for immunogenicity for the first time in newly developed vaccination schemes, no power calculation for the size of the treatment or the control groups is performed. Data obtained in these studies will be used for power calculations for future experiments. Also, since the resolution of the readout parameter(s) is likely to differ between studies (these can be ELISA values, virus neutralization titers, immunoglobulin levels, etc.), future power analysis calculations will differ between studies. These will be provided upon submission of the final working protocol to the IvD. The *maximum* group size for the studies in these module will be 10.

Using statistical Power analysis tools, the number of animals required for each study will be calculated specifically for each study and provided to the IvD. As described above, a maximum of 10 animals per treatment group is considered adequate. Based on the number of studies to be performed over a 5 year period, the maximum total number of animals to be used in this part of the project is 1000.

This maximum number of animals to be used is an estimate based on the expected number of studies to be performed, which is unclear, as the applicant performs these studies as a contract research organization for third parties. The actual number of studies that will be carried out depends on the number of contracts that are realized over the 5 year period for which the project proposal applies. The table below gives an expected breakdown of the number of animals required for this part of the 5 year project proposal.

Module	Group Size	Estimated Number of Groups	Estimated Number of Experiments in 5 years	Total Number of Animals/Module in 5 years
3	10	10	10	1000

B. The animals

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

Species: Mice

Justification: Mice are internationally recognized as a relevant (preclinical) animal model for rabies that not only allows research into disease mechanisms but also the testing of newly developed and/or improved prophylaxis or treatment regimens. Disease progression, transport in the brain and appropriate challenge virus doses have been the subject of thorough research in this model. Both outbred mice (e.g. CD-1, NMRI or Swiss) or inbred mice (e.g. BALB/c or C57BL/6) will be used. Because of group housing conditions, preferably female mice will be used.

Origin: Registered breeder/supplier in Europe

Estimated numbers: see Calculation of number of animals.

Life stages: new born to adult, depending on the virus strain, prophylactic or therapeutic regimen to be used for a particular study. Use of new borns may be required in case a rabies virus strain is to be used in Modules 1 and/or 4 that requires a more sensitive infection model than (young) adult mice, based on the fact that for diagnostic purposes the use of new borns is described in the mouse inoculation test (OIE Terrestrial Manual, 2013).

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.

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

Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation, that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

The effect of antiviral compounds or vaccines on improvement of the clinical course of rabies infection and/or increasing survival rates after rabies virus

infection can only be studied in vivo as no in vitro alternatives currently exist. Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

Reduction:

Statistical power analysis (see above) will be provided for each study to be performed under the project proposal to ensure statistically significant results using the minimum number of animals required. The provided power analysis is prospective. Based on the outcome of the first studies, the power analysis will be refined in order to further minimize the number of animals to be used in subsequent studies.

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

- 1) For administration, sampling and euthanasia procedures, the animals will be sedated using isoflurane anesthetic procedures.
- 2) All procedures will be performed using equipment and facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

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.

n.a.

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.

Animal handling for administration and sampling purposes will be performed under anesthesia in order to limit discomfort and distress.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

N.a.

Explain why these effects may emerge.

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

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.

Indicate the likely incidence.

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').

Administration procedures, brief: moderate

Sampling procedures, brief: moderate

Overall maximum severity is considered 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.

Animals will be euthanized to collect blood and organs. Up to 100% of non-treatment groups may be killed due to a humane endpoint.

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.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'. 90500
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. BioXpert BV
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 4 | Module 4: Determination of the prophylactic and/or therapeutic efficacy of rabies virus specific antiviral products in mice |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The animal procedures in this part of the project proposal are designed to determine the efficacy of antiviral compounds and/or the immunogenicity of rabies vaccine preparations against rabies virus infection is assessed.

The primary outcome parameters of this module are: prevention of clinical symptoms and survival.

Protection against rabies by vaccination or antiviral compounds can act through various mechanisms, which drives the choice of the challenge model (virus strain, route of challenge infection). Since it remains unclear how exactly the virus is transmitted from the site of infection to the central nervous system and how long this transport takes, demonstration of efficacy against replication in the central nervous system may require the use of intracranial (i.c.) challenge models. Also, in cases where virus strains are to be used for which no robust peripheral (i.m.) challenge dose is available that accommodates use of survival as a primary readout parameter, an i.c. challenge is required. Although primary i.c. infection in field situations has never been reported, the i.c. challenge is a valuable asset of the mouse/rabies model that allows efficacy assessment of anti-rabies intervention strategies. In cases where experiments are performed that will be used for registration purposes of newly developed vaccines, use of an i.c. challenge model may be required (FDA and Ph. Eur regulations).

The administration route of a virus for a particular study within this module depends on the nature of the product(s) to be tested and the challenge model in which they are to be tested. In cases where the product exerts its antiviral function in the brain (either directly (e.g. an antiviral preparation that can cross the blood brain barrier) or indirectly (e.g. a vaccine preparation) via induced immune responses), the administration route of the virus preparation can be the intracranial (i.c.) or intranasal (i.n.) route. In cases where the product exerts its function outside of the brain, a peripheral, i.e. intramuscular (i.m.), challenge will be used. Additionally, kinetics of the antiviral product to be tested may influence the choice of the infection route, e.g. in the case of a RNA or DNA based product from which the effector molecule(s) need(s) to be expressed before it can exert its function, the challenge route can be intracranially or intranasally if the bioavailability is quick or intramuscular if bioavailability requires prolonged incubation after administration. Furthermore, when a product to be tested is to be applied intracranially, this will also drive the choice of the infection route. In cases where virus strain, challenge dose and route are unknown, these will be determined in studies carried out in Module 1 of the project proposal (pilot dose and dose finding for new/unknown virus strains or inoculation routes). Which challenge model is to be used and if (pilot) dose finding studies will be required before studies in this module can be designed and performed will be clearly indicated when submitting the working protocols to the AWB.

Rabies virus infection is lethal. Infected animals will develop rabies disease manifested with neurological symptoms of paralysis and die as result of encephalitis. Typically, after peripheral inoculation with a lethal dose of rabies virus, mice will develop ruffled hair approximately 5-7 days post infection and within 2-4 days will further develop hind-leg paralysis and die as a result of infection. The clinical signs are scored using Phases, the features of which are described below.

Phase 1: Only ruffled hair: early sign of encephalitis, typically lasting 2-4 days.

Phase 2: Ruffled hair AND hunched back. Progression to rabies encephalitis.

Phase 3: Ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis.

The animals that are challenged with rabies virus in module 3 will be euthanized as soon as they reach Phase 3 (humane end point for euthanasia).

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

Animal procedures for testing the efficacy of a therapeutic agent:

On the day of challenge infection the animals are weighed and a blood sample is taken for analysis purposes. The animals will then be challenged either intramuscularly, intranasally or intracranially (based on criteria described above) with rabies, followed by daily weighing and scoring of clinical signs

(Phases 1 to 3). Subsequently, depending on the product, one or multiple administrations may be used. Routes may be i.c., i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested. In case of multiple administrations, the intervals can range from several days to weeks. The information on which these parameters (timing, frequency and route of administration) are chosen originates from either available information from the provider of the product, available results from previous experiments or results obtained in Module 1 (virus challenge parameters (dose and route)) and Module 2 of the current animal procedure (administration parameters of the product to be tested (pharmacokinetics)) in the context of the project. This background information and the final study design will be provided to the IvD when submitting the working protocols for each study to be performed within the context of this module.

Animals will be euthanised as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). The post challenge follow up period is 28 days. Surviving animals will be euthanised at the end of the study on day 28.

Animal procedures for testing the efficacy of a prophylactic agent/vaccine:

Depending on the product, one or multiple administrations may be used. Routes may be i.c., i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c., depending on the product to be tested. In case of multiple administrations, the intervals can range from several days to weeks. The information on which these parameters (timing, frequency and route of administration) are chosen originates from either available information from the provider of the product, available results from previous experiments or results obtained in Module 1 (virus challenge parameters (dose and route)) and Modules 2 or 3 (administration parameters of the product to be tested (pharmacokinetics and/or immunogenicity)) in the context of the project. This background information and the final study design will be provided to the IvD when submitting the working protocols for each study to be performed within the context of this module. After completion of the administration schedule, the animals are weighed on the day of challenge infection and a blood sample is taken for analysis purposes. The animals will then be challenged either intramuscularly, intranasally or intracranially (based on criteria described above) with rabies, followed by daily weighing and scoring of clinical signs (Phases 1 to 3).

Animals will be euthanised as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). The post challenge follow up period is 28 days. Surviving animals will be euthanised at the end of the study on day 28.

Blood sampling will be done via the facial vein (submandibularly), individual sampling volumes will not exceed 100µl. Total blood sampling volume will not surpass 8 ml/kg/28 days (~0.3 ml). Maximum blood sampling frequency will be once per week.

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

Calculation of number of animals

All animals will be enrolled at the experiment at the same time point and will be followed up for 28 days. Based on available data or data generated in the (pilot) dose finding modules, it is expected that the used challenge dose can result in 50% to 100% fatality.

For efficacy testing of antiviral compounds through determination of survival rates in case of a 100% lethal challenge dose infection after intracranial or intranasal infection, prior data indicate that the median survival time of non-treated mice is 8 days (Terry, *PLoS One*, 2014). If the true median survival times in the control (non-treated) and experimentally treated groups are 8 and 28 days, respectively, we will need to study 15 experimental subjects and 15 control subjects to be able to reject the null hypothesis that the experimental and control survival curves are equal with a probability (power) of 0.8. The Type I error probability associated with this test of this null hypothesis is 0.05.

For vaccine studies using a 50% lethal dose 16 experimental subjects vs. 16 animals control subjects are needed to reject the null hypothesis that the experimental and control survival rates are equal with a probability (power) of 0.8. The Type I error probability associated with this test of this null hypothesis is 0.05.

For vaccine studies using a 100% lethal dose 8 experimental subjects vs. 8 animals control subjects are needed to reject the null hypothesis that the experimental and control survival rates are equal with a probability (power) of 0.8. The Type I error probability associated with this test of this null

hypothesis is 0.05.

Using statistical Power analysis tools, the number of animals required for each study will be calculated specifically for each study, a maximum of 16 animals per treatment group is considered adequate. Based on the number of studies to be performed over a 5 year period, the maximum total number of animals to be used in this part of the project is 1200.

See analysis below for group size determination. The maximum number of animals to be used is an estimate based on the expected number of studies to be performed, which is unclear, as the applicant performs these studies as a contract research organization for third parties. The actual number of studies that will be carried out depends on the number of contracts that are realized over the 5 year period for which the project proposal applies. The table below gives an expected breakdown of the number of animals required for this part of the 5 year project proposal.

Module	Group Size	Estimated Number of Groups	Estimated Number of Experiments in 5 years	Total Number of Animals/Module in 5 years
4	16	5	15	1200

B. The animals

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

Species: Mice

Justification: Mice are internationally recognized as a relevant (preclinical) animal model for rabies that not only allows research into disease mechanisms but also the testing of newly developed and/or improved prophylaxis or treatment regimens. Disease progression, transport in the brain and appropriate challenge virus doses have been the subject of thorough research in this model. Both outbred mice (e.g. CD-1, NMRI or Swiss) or inbred mice (e.g. BALB/c or C57BL/6) will be used. Because of group housing conditions, preferably female mice will be used.

Origin: Registered breeder/supplier in Europe

Estimated numbers: see Calculation of number of animals in section A.

Life stages: newborn to adult, depending on the virus strain (see section A, Experimental approach and primary outcome parameters), prophylactic or therapeutic regimen to be used for a particular study. Use of new-borns may be required in case a rabies virus strain is used that requires a more sensitive infection model than (young) adult mice, based on the fact that for diagnostic purposes the use of new-borns is described in the mouse inoculation test (OIE Terrestrial Manual, 2013).

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.

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

Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation, that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

The effect of antiviral compounds or vaccines on improvement of the clinical course of rabies infection and/or increasing survival rates after rabies virus infection can only be studied in vivo as no in vitro alternatives currently exist. Mice have been established in the literature as a good animal model to study (prevention of) rabies infection and disease. To study the efficacy of antiviral intervention strategies, be they chemical entities, monoclonal antibodies or vaccines, several protocols have been established based on different challenge virus strains and their routes of inoculation that allows research into new potential anti-rabies products in a relevant preclinical model.

Reduction:

Statistical power analysis (see above) will be provided for each study to be performed under the project proposal to ensure statistically significant results using the minimum number of animals required. The provided power analysis is prospective. Based on the outcome of the first studies, the power analysis will be refined in order to further minimize the number of animals to be used in subsequent studies.

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

- 1) For infection and euthanasia procedures, the animals will be sedated using isoflurane anesthetic procedures. Also, the animals will be scored daily for the appearance of clinical signs based on the scoring system described above. Rabies virus infection is lethal when the virus reaches and starts to replicate in the brain. A clinical scoring system is deployed to prevent unnecessary discomfort to infected animals. When Phase 1 of the clinical scoring system is reached, the observation frequency will be increased to twice daily. As soon as animals enter Phase 3 (humane end point) of the clinical scoring system they will be killed.

In order to reject the null hypothesis that survival curves are equal, a valid comparison between treated and non-treated (control) groups is needed and therefore animals are not taken out of experiment unless they reach phase 3 of disease. Animals in disease phases up to 2 still have the possibility to experience a prolonged survival dependent on (the efficacy of) the treatment under study.

- 2) All procedures involving rabies virus will be performed in DM-III equipment/facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.
-

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.

n.a.

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.

Animal handling for administration, infection and sampling purposes will be performed under anesthesia in order to limit discomfort and distress.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Rabies virus targets the central nervous system upon infection, causing tremor, paralysis (of the hind legs) and ultimately results in death if untreated.

Explain why these effects may emerge.

Untreated ongoing infection with rabies will result in virus replication in the central nervous system.

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

Humane endpoints have been determined to minimise animal suffering that might occur during these studies. The animals will be checked on a daily basis, a frequency that can be increased should specific clinical signs arise (see section J for details on clinical signs and humane endpoint definition)

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.

The animals will be checked daily for signs of disease and twice daily (every 12 hours) after the first signs of disease appear (i.e. ruffled hair). The animals will be euthanized by cervical dislocation under isoflurane anesthesia when they reach humane end points for euthanasia. The humane end points include ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis. In more detail, rabies encephalitis is expected to follow the course outlined below:

Phase 1: Only ruffled hair: early sign of encephalitis, lasting 2-4 days. From this point forward, animals will be checked every twelve hours for progression to rabies encephalitis.

Phase 2: Ruffled hair AND hunched back. Progression to rabies encephalitis.

Phase 3: Ruffled hair AND hunched back AND hind leg paralysis: animals will be euthanized as soon as they reach Phase 3 (humane end points for euthanasia). Animals in disease phases up to 2 still have the possibility to experience a prolonged survival dependent on the (efficacy of the) treatment under study.

Indicate the likely incidence.

Depending on the rabies challenge model used the incidence will range from 50% to 100% of animals in non-treatment groups. The incidence in treatment groups will range from 0% to 100%, depending on the efficacy of the products to be tested and on the rabies challenge model.

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').

Administration procedures, brief: moderate (i.v., i.m., i.n., i.p. or s.c), severe (i.c.)

Sampling procedures, brief: moderate

Infection procedures, brief: moderate (i.m., i.n.), severe (i.c.)

Rabies virus infection and development of disease: moderate based on the application of humane endpoints.

Overall maximum severity is considered moderate based on the brevity of severe procedures and the application of humane endpoints

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.

Animals will be euthanized to collect blood and organs. Up to 100% of non-treatment groups may be killed due to a humane endpoint.

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

Format DEC-advies concept

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer AVD905002015124
2. Titel van het project: Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.
3. Titel van de NTS: Testen van anti-rabies behandelings strategieën in muizen.
4. Type aanvraag:

nieuwe aanvraag projectvergunning

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: DEC-Consult
- telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
- mailadres contactpersoon: [REDACTED]

6. Adviestraject (data):

ontvangen door DEC: 2 juni 2015

aanvraag compleet: 1 juli 2015

in vergadering besproken: 10 juni 2015, 8 juli 2015

anderszins behandeld: schriftelijk, via email 19 juni 2015

termijnonderbreking(en) van / tot: nvt

besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen : nvt

aanpassing (concept) aanvraag 19 juni 2015, 1 juli 2015

advies aan CCD

7. Eventueel horen van aanvrager nvt

8. Correspondentie met de aanvrager

- **Datum 12 juni 2015 (completering aanvraag)**
- **Projectgedeelte:**
- De looptijd van het project nader onderbouwen.
- Punt 3.1: De stand van wetenschap en praktijk m.b.t. vaccinatie tegen rabiës en behandeling van een rabiësinfectie beter weergeven.
- Punt 3.2: verduidelijken op basis van welke ingangscriteria vaccins en therapeutica in proefdieren getest zullen worden.

- Punt 3.3: Nader toelichten wat het belang is. Er zijn al werkzame vaccins en *post exposure* profylaxe.
- Punt 3.4. meerdere typen dierproeven onderscheiden.
- **Appendix dierproeven:**
- nader toelichten van de primaire uitkomst parameters voor PK en PD
- Intracraniale injecties: waarom zijn die nodig in de context van dit project; inschatting van het ongerief van die injecties.
- Bij modules 3 en 4 moet zicht worden gegeven op de frequentie en methode van afname en de maximale volumina (per keer en over de tijd gezien). Geen gedetailleerde schema's maar wel begrenzing in het licht van dierenwelzijn.
- geen wettelijk voorgeschreven onderzoek. Vraag E is n.v.t.
- Pijn en ander ongerief dienen uit elkaar gehaald te worden.
- Ongerief inschattingen, toepassen humane eindpunten
- **NTS:**
- De NTS zal moeten worden aangepast aan het aangepaste projectvoorstel. Let op de lengte.
- **Reactie van de aanvrager (19 juni 2015):** De aanvrager heeft de aanvraag gecompleteerd en aangepast.
- **Vragen (26 juni 2015)**
- **Algemeen**
- De categorie "registratie doeleinden" wordt niet aangekruist. Dan kan het verwarrend zijn wanneer later in de projectbeschrijving en de dierproeven wel een eis van FDA en EMA wordt genoemd.
- Het is niet duidelijk waarom en wanneer er van welke virus stam gebruik gemaakt zal worden en waarom er in sommige gevallen *newborn* dieren nodig zijn.
- **M.b.t. formulieren dierproeven 1-4:**
- Verzoek om consequent dezelfde nummers en termen te gebruiken, teneinde verwarring te voorkomen. Enkele niet lopende zinnen verbeteren.
- Het ongerief van de i.c. toediening wordt geclassificeerd als ernstig. Dit dient nader toegelicht te worden.
- **M.b.t. NTS:**
- De ongerief inschatting (maximaal matig ongerief) komt niet overeen met de ongerief inschatting in de dierproeven (maximaal ernstig ongerief).
- **Antwoorden van de aanvrager (1 juli 2015):**
- Registratie doeleinden (Regulatory use or routine production) is aangekruist voor het geval zich proeven voor zullen doen waarin aan genoemde eisen voldaan dient te worden.
- De keuze van de virusstam en route van infectie zijn afhankelijk van een aantal factoren welke omschreven zijn in Sectie A van de modules waarin

infectieprocedures met rabiesvirus gebruikt worden. In de documenten is een verwijzing naar de desbetreffende sectie toegevoegd en de volgende onderbouwing voor het gebruik van pasgeborenen van de zgn. Life stages is verkort opgenomen in Sectie B. The Animals: Het gebruik van pasgeborenen kan nodig zijn indien voor het kunnen detecteren van een bepaald rabiesvirus een gevoeliger infectiemodel gewenst is dan jong volwassen muizen. In de rabiesdiagnostiek is het gebruik van pasgeborenen onderdeel van de zgn. mouse inoculation test (MIT) die wordt toegepast indien celweekmethoden niet beschikbaar en/of toereikend zijn (WHO Laboratory Techniques in Rabies; OIE Terrestrial Manual 2013). Indien virusstammen gebruikt worden waarvoor geen geschikte infectiedosis vastgesteld kan worden in (jong) volwassen muizen, kan het nodig zijn om gebruik te maken van pasgeborenen.

- Dit is gecorrigeerd in de nieuwe versie van het document.
- In een rapport over verfijning van toedieningsprocedures (Morton et al., *Laboratory Animals*, 2001) wordt het ongerief van deze procedure (i.c. injectie) geclassificeerd als ernstig ten gevolge van de welfare impact (citaat: "Most impact: e.g. anaesthesia may be required (with attendant risks), death or serious injury could result from incorrect technique. Notes: The scoring system refers to the impact of the route, not the substance, and assumes that the technique is carried out by trained and competent staff with appropriate resources"). Vanzelfsprekend wordt bij ons de techniek uitgevoerd door getraind en competent personeel. Het ongerief van de procedure op zichzelf is dus als ernstig gekwalificeerd en is kort van duur.
- De NTS is gecorrigeerd in de nieuwe versie van het document.

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 vergunningplichtig (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 aanwezige DEC-leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het betreft het testen

(farmacokinetiek, immunogeniteit en/of werkzaamheid) van nieuw ontwikkelde antivirale interventiestrategieën tegen Rabiës in de relevante preklinische muismodellen waarover de aanvrager beschikt. Hoewel reeds vaccins en *post exposure* profylaxe (PEP) beschikbaar zijn, is er behoefte aan betere vaccins en antilichaampreparaten, die effectiever en goedkoper zijn dan de huidige middelen. Daarnaast is er op dit moment geen goede behandeling beschikbaar voor het stadium van Rabiës waarin PEP niet meer werkt. Ook voor dat stadium zullen kandidaat middelen getest worden. De beschikbaarheid en toepasbaarheid van deze middelen in ontwikkelingslanden, waar het Rabiësprobleem het grootst is, kan nog verbeterd worden. Dit laatste heeft de DEC ook meegewogen bij haar inschatting van het belang van dit project. Tenslotte is het testen van de nieuw ontwikkelde middelen in een relevant preklinisch diermodel een onontkoombare stap op weg naar toepassing van die middelen in mensen. Het belang wordt daarom door de DEC ingeschat als substantieel.

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. De aanvrager zelf benoemt dit op verschillende plaatsen in de aanvraag als licht tot ernstig en gemiddeld matig. De DEC is er in haar afweging uitgegaan dat 50 procent van de dieren in de virus dosefinding proeven in appendix 1 met kortdurend ernstig ongerief zullen worden geconfronteerd (= humaan eindpunt). Dit geldt eveneens voor de dieren in appendix 4 die onbeschermd worden gechallenged met het virus of waarbij het te testen antivirale middel mogelijk niet voldoende bescherming biedt. Het exacte percentage is op voorhand niet goed in te schatten. Het ernstige ongerief heeft dus betrekking op dieren die na een challenge met het Rabiësvirus terecht komen in wat door de aanvrager wordt aangeduid als fase 3 (gekenmerkt door een onverzorgde vacht, kromme rug/ineengedoken zitten en verlamming van de achterpoten). De aanvrager geeft nadrukkelijk aan hij er voor zal zorgen dat deze situatie met ernstige ongerief zo kort mogelijk zal duren door de dieren regelmatig te monitoren en op humane wijze te doden, zodra zij deze fase 3 bereiken. Alle overige dieren ondervinden kortdurend matig ongerief als gevolg van de toediening van antivirale middelen, bloedafnames en de toediening van het rabiësvirus (niet de gevolgen daarvan) via verschillende injectieroutes. De aanvrager classificeert het ongerief bij het uitvoeren van de intracraniale injecties als kortdurend ernstig ongerief.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De te onderzoeken middelen zijn voorafgaand aan de dierproef *in vitro* getest (op basis van *in vitro* onderzoek geselecteerd). Het uiteindelijk bepalen van de effectiviteit van een preventieve- of therapeutische antivirale behandeling dient op grond van klinische verschijnselen (voorkomen van ziekte en/of sterfte) te geschieden en is daarom niet mogelijk zonder het gebruik van proefdieren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximaal aantal te gebruiken dieren per studie 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. De aanvrager heeft beargumenteerd dat het bij de challenge van de muizen met het Rabiësvirus noodzakelijk is om te wachten met het toepassen van een humaan eindpunten tot het moment dat de symptomen van fase 3 zich voordoen (zie punt 6 hierboven). Dieren in fase twee zouden namelijk nog kunnen herstellen als gevolg van de behandeling. Ik vind dit niet echt een logisch betoog. Het komt erop neer dat de indieners aangegeven hebben dat 'dood' de enige toepasbare meet parameter in deze studies is. Het toepassen van de humane eindpunten kan dientengevolge pas op het moment waarop het duidelijk is dat het dier uiteindelijk zal overlijden en zijn erop gericht deze laatste fase voor het dier te bekorten. Het is aangetoond dat het optreden van symptomen van fase 3 deze voorspellende waarde hebben. Daarom is ook gekozen voor het optreden van fase 3 symptomen als humaan eindpunt. Fase 2 symptomen zijn geen goede voorspeller voor het doodgaan van het dieren. Dieren kunnen hiervan nog herstellen.

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

D. Ethische afweging

Infectie met Rabië is dodelijk, indien niet tijdig *post exposure* profylaxe (PEP) wordt toegediend. Er zijn op dit moment geen middelen die het klinische verloop van Rabië gunstig kunnen beïnvloeden in een stadium waarin PEP niet meer werkt. De huidige vaccins en PEP zijn weliswaar werkzaam, maar er is ruimte voor verbetering, niet alleen wat betreft de werkzaamheid, maar ook voor wat betreft het beschikbaar maken van goede en goedkope middelen voor toepassing in ontwikkelingslanden, waar het Rabiëprobleem verreweg het grootst is. Dit laatste vindt de DEC een belangrijke overweging in de ethische afweging. Het testen van veelbelovende nieuwe middelen in een preklinisch diermodel is een onontkoombare stap op weg naar uiteindelijke toepassing van deze middelen in de mens. De DEC schat het belang van dit project daarom in als substantieel. Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en vermindering. Het is niet mogelijk dit onderzoek bij mensen uit te voeren en voor het ultieme bewijs van bescherming bij of tegen infectie zijn geen *in vitro* of *ex vivo* alternatieven beschikbaar.

Tegenover dit reële belang staat dat een deel van de dieren gedurende korte tijd ernstig ongerief zullen ondervinden. De DEC acht het belang van het beschikbaar komen van betere en goedkopere middelen voor de behandeling van Rabië, groot genoeg om de uitvoering van de voorgestelde dierproeven te rechtvaardigen, mits ernstig ongerief zoveel mogelijk voorkomen wordt en de duur ervan tot een minimum beperkt wordt door het strikt toepassen van de genoemde humane eindpunten.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarde

- Op grond van de wettelijk vereiste (risico op (kortdurend) ernstig ongerief), dient de projectleider bij beëindiging van het project een rapportage in te sturen naar de CCD die is afgestemd met de IvD.
- 2.** Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> 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.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015124

Datum 14-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
2

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 14 juli 2015.

Het aanvraagnummer dat wij hieraan hebben gegeven is AVD905002015124. Gebruik dit nummer als u contact met ons 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 ontvangen. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



Centrale Commissie Dierproeven

> 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.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
905002015124

Factuurdatum	14 juli 2015
Vervaldatum	14 augustus 2015
Factuurnummer	201570124
Betreft	Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

Omschrijving

Betaling leges projectvergunning dierproeven
Betreft aanvraag 201570124

Bedrag

€ 741,-

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.



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 0900-2800028 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD905002015124

Bijlagen

1

Datum 20 augustus 2015

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 14 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' met aanvraagnummer AVD905002015124. Op 28 juli 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld na aanleiding van de door ons gestelde vragen. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag gedeeltelijk goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' starten, maar alleen met de dierproeven 1 en 2. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen. De vergunning wordt afgegeven van 20 augustus 2015 tot en met 31 mei 2020. De begindatum van de vergunning wijkt af van uw aanvraag omdat de startdatum op uw aanvraag in het verleden ligt.

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 om onderstaande redenen niet volledig vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Een deel van uw project is gericht op farmaca onderzoek (dierproeven 1 en 2) en een ander deel op het testen van vaccins (dierproeven 3 en 4). Wij zijn van mening dat er onvoldoende inhoudelijke samenhang is tussen deze twee afzonderlijke componenten. Wij vinden dat uw project twee verschillende doelstellingen heeft die in twee aparte aanvragen moeten worden behandeld. Om deze reden zien wij uw aanvraag niet als een toetsbare eenheid. Om deze reden kunt u de dierproeven 1 en 2 onder deze vergunning uitvoeren, maar voor de dierproeven 3 en 4 moet u een aparte aanvraag indienen.

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

Bezwaar

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

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

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

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

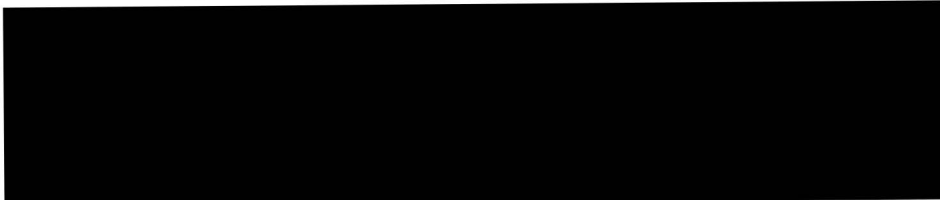
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

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 deeluitmakend: - DEC-advies
- Weergave wet en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 augustus 2015 tot en met 31 mei 2020, voor het project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' met aanvraagnummer AVD905002015124, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-Consult.

De functie van de verantwoordelijke onderzoeker is manager preclinical services.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen bij digitale indiening op 14 juli 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 14 juli 2015;
 - b. Niet-Technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 14 juli 2015, en aangepast op ;
 - c. Advies van dierexperimentencommissie DEC-Consult ontvangen op 14 juli 2015;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 28 juli 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren voor het vergunde tijdvak	Ernst
Module 1: Rabies virus dose-finding in mice	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	248	Matig en ernstig
Module 2: Determination of the pharmacokinetics of rabies virus specific antiviral products in mice	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	96	Matig en ernstig

Voorwaarde:

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

- 1) De aanvrager zal voor elke studie samen met de IvD het gebruik van dieren van beiden geslachten overwegen.
- 2) Indien later, in het kader van het project, proeven worden gedaan waarin aan de eisen van het wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie dient te worden voldaan, moet de aanvrager vooraf met de IvD afstemmen of er sprake van herhaling is.
- 3) In Artikel 10, eerste lid, onder a, Wet op de dierproeven, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij

Datum
20 augustus 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD905002015124

de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Beoordeling achteraf:

Aangezien er sprake is van ernstig ongerief, is een beoordeling achteraf vereist. Deze moet plaatst vinden binnen een jaar na afloop van het project, dus vóór 31 mei 2021.

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 die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal binnen een jaar na afloop van de vergunning 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.

[REDACTED]

Van: ZBO-CCD
Verzonden: maandag 1 juni 2015 17:02
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanvraag CCD-dossiernummer

Beste [REDACTED]

Zoals gevraagd hierbij een AVD905002015124, voor het project Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.

Wilt u bij verdere correspondentie altijd het dossiernummer vermelden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.zbo-ccd.nl
Nationaal Comité advies proefdierbeleid

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 1 juni 2015 16:41
Aan: ZBO-CCD
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvraag CCD-dossiernummer

Beste [REDACTED]

Namens de vergunninghouder van BioXpert wil ik bij deze een CCD-nummer aanvragen voor het volgende projectvoorstel:

Instelling: BioXpert B.V.

Instellingsnummer: 90500

Project: Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

BioXpert B.V.
Nistelrooise Baan 3
5374 RE Schaijk

[REDACTED]
T: +31 (0) 486 463303
F: +31 (0) 486 463498

KvK: 54838134

Confidentiality Notice: This e-mail transmission may contain confidential or legally privileged information that is intended only for the individual or entity named in the e-mail address. If you are not the intended recipient, you are hereby notified that any disclosure, copying, distribution, or reliance upon the contents of this e-mail is strictly prohibited. If you have received this e-mail transmission in error, please reply to the sender, so that we can arrange for proper delivery, and then please delete the message from your inbox. Thank you.

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 24 juli 2015 13:08
Aan: Info-zbo; [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: Aanvullende informatie aanvraag AVD905002015124
Bijlagen: AVD905002015124 - Antwoord op vraag CCD 24Jul2015.docx

Categorieën: Dossierhouder: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Hierbij ontvangt u het antwoord van de verantwoordelijk onderzoeker op uw vraag.
Met vriendelijke groeten,
[REDACTED]

[REDACTED]

[Register now for Laboratory Animal Science on October 15th!](#)



www.radboudumc.nl/las2-0

BioXpert B.V. | Nistelrooise Baan 3 | 5374RE Schaijk | +31 486463303 | www.bioxpert.nl |

KvK: 54838134, VAT NL.8514.59.687.B01 Our terms are deposited at the Chamber of Commerce in Eindhoven, the Netherlands.

Confidentiality Notice: This e-mail transmission may contain confidential or legally privileged information that is intended only for the individual or entity named in the e-mail address.

If you are not the intended recipient, you are hereby notified that any disclosure, copying, distribution, or reliance upon the contents of this e-mail is strictly prohibited.

If you have received this e-mail transmission in error, please reply to the sender, so that we can arrange for proper delivery, and then please delete the message from your inbox. Thank you.

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: donderdag 23 juli 2015 17:51
To: [REDACTED]
Cc: [REDACTED]
Subject: Aanvullende informatie aanvraag AVD905002015124

Geachte [REDACTED]

Op 14 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' met aanvraagnummer AVD905002015124. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk woensdag, 29 juli 2015, uw antwoord aan ons te sturen.

Met vriendelijke groet,



Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

[REDACTED]
Nistelrooise Baan 3
5374RE Schaijk
[Barcode]

**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
AVD905002015124

Datum 23 juli 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen

1

Geachte [REDACTED],

Op 14 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' met aanvraagnummer AVD905002015124. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van vrouwelijke muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan beter onderbouwen waarom het belangrijk is alleen vrouwelijke dieren te gebruiken?

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk woensdag, 29 juli 2015, uw antwoord aan ons te sturen.

Wanneer een beslissing

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

Datum

23 juli 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD905002015124

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

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

2 Bijlagen

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

3 Ondertekening

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

Aan: IvD BioXpert, CCD

Betreft Aanvullende informatie onderzoeksplan getiteld: Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice. (CCD nr: AVD905002015124).

Datum: 24 juli 2015

Beste leden van de IvD / Geachte leden van de CCD,

Met referentie naar uw verzoek om aanvullende informatie ontvangen op 23 juli 2015 stuur ik u hierbij mijn antwoord op de vraag gesteld in uw schrijven.

Vraag:

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van vrouwelijke muizen. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan beter onderbouwen waarom het belangrijk is alleen vrouwelijke dieren te gebruiken?

Antwoord:

In de beschrijving van de dierproeven is aangegeven dat er bij voorkeur gewerkt zal worden met vrouwelijke dieren i.v.m. de gewenste groepshuisvesting. Groepshuisvesting van vrouwelijke muizen is flexibeler dan die van mannelijke muizen aangezien vrouwelijke dieren uit verschillende nesten doorgaans probleemloos bij elkaar gezet kunnen worden. Bij mannelijke muizen ligt dit anders en om ongewenste stress als gevolg van agressie te vermijden is het wenselijk om mannen op het moment van spenen (ong. 3 weken oud) in groepshuisvesting te plaatsen. De voorkeur voor vrouwelijke muizen is mede gelegen in het feit dat de meeste studies in het kader van het projectvoorstel uitgevoerd zullen worden met dieren die ouder zijn dan de speenleeftijd, waardoor bij het samenstellen van de studiegroepen voor huisvesting de kans op stress ten gevolge van agressie geminimaliseerd wordt bij gebruik van vrouwelijke dieren.

Daarnaast is stress als gevolg van een veranderende groepsamenstelling bij mannelijke dieren een factor waarmee rekening is gehouden bij het besluit om bij voorkeur vrouwelijke dieren te gebruiken: aangezien door het verloop van de rabiesinfecties in de beschreven proeven muizen bij het bereiken van de humane eindpunten uit de proef worden genomen is er sprake van een veranderende groepsamenstelling. Bij groepen met enkel mannen zou dit dus kunnen leiden tot extra stress, hetgeen vermeden kan worden door het gebruik van vrouwelijke dieren.

Verder is het zo dat voor een aantal rabiesvirusstammen waarvoor de optimale infectiedosis en –route reeds bepaald is, deze zgn. (pilot)dose-finding studies (gelijk aan die beschreven in Module 1) in het verleden allemaal uitgevoerd zijn in vrouwelijke dieren. Om voor deze stammen bij toekomstige studies in het kader van het projectvoorstel gebruik te kunnen maken van dieren van beide geslachten zullen eerst nieuwe dose-finding studies uitgevoerd moeten worden in mannelijke muizen vóórdat de profylactische dan wel therapeutische studies van Module 4 uitgevoerd kunnen worden, hetgeen extra proefdiergebruik met zich meebrengt t.o.v. de situatie waarin gebruik gemaakt wordt van enkel vrouwelijke muizen.

Dat gezegd hebbende is voor studies waarbij gebruik gemaakt zal worden van dieren die bij aflevering jonger zijn dan 3 weken geen noodzaak om enkel vrouwelijke dieren te gebruiken – hiermee zal bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD rekening worden gehouden en bij het bestellen van de dieren zal in deze gevallen geen voorkeur voor vrouwelijke dieren gehanteerd worden. Tevens zal bij

gebruik van nieuwe rabiesvirusstammen waarvoor studies in Module 1 (dose-finding) uitgevoerd dienen te worden, rekening gehouden worden met de door de CCD aangehaalde wens om het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen en deze overweging mee te nemen in de keuze voor het muizenmodel. Ook zal hierbij gekeken worden naar de voorraad bij de leverancier van de muizen, omdat bekend is dat er op verschillende momenten sprake kan zijn van een overschot aan vrouwelijke dan wel mannelijke dieren.

Ik hoop u hiermede voldoende te hebben geïnformeerd om de beoordeling van dit projectvoorstel af te ronden.

Met vriendelijke groeten,

[Redacted signature]

Verantwoordelijk onderzoeker

Viroclinics Biosciences B.V.
Rotterdam Science Tower
Marconistraat 16
3028 AK Rotterdam

[Redacted contact information]

[Redacted contact information]

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 18 augustus 2015 11:24
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: verzoek aangepaste NTS AVD905002015124

Geachte [REDACTED]

Op 14 juli 2015 hebben we van u een NTS getiteld 'Testen van anti-rabies behandelings strategieën in muizen' ontvangen waarin enkele fouten zitten:

- het gemiddelde ongerief wordt "berekend", en dat is niet de bedoeling. De hoogste categorie ongerief moet worden vermeld, of de categorieën die bij de dierproeven horen en niet het individuele of gemiddelde ongerief. In uw geval is dat matig en ernstig.

- 'wettelijk vereist onderzoek of routinematig productie' is niet aangekruist.

We verzoeken u om zsm een aangepaste versie van uw NTS naar ons te sturen. Het kan via de NetFTP verbinding, of via de email.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Aan: IvD BioXpert, CCD

Betreft Wijziging NTS behorende bij het onderzoeksplan getiteld: Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice. (CCD nr: AVD905002015124).

Datum: 19 Augustus 2015

Beste leden van de IvD / Geachte leden van de CCD,

Met referentie naar uw verzoek voor wijziging van de NTS ontvangen op 17 augustus 2015 stuur ik u hierbij de aangepaste versie van de NTS. Hieronder ook een verduidelijking van de aangepaste punten

Aanpassing 1:

Het gemiddelde ongerief wordt "berekend", en dat is niet de bedoeling. De hoogste categorie ongerief moet worden vermeld, of de categorieën die bij de dierproeven horen en niet het individuele of gemiddelde ongerief. In uw geval is dat matig en ernstig.

Het gemiddelde ongerief is gewijzigd naar het daadwerkelijke ongerief. De tekst in de NTS is overeenkomstig aangepast naar: "Het ongerief van de dierproeven is ingeschaald op matig (op basis van het verloop van de infectie) en in sommige gevallen op ernstig (op basis van de toedieningswijze).".

Aanpassing 2:

'wettelijk vereist onderzoek of routinematig productie' is niet aangekruist

Per abuis is dit niet meegenomen van de project aanvraag naar de NTS. In de bijgevoegde NTS is deze optie wel aangekruist.

Ik hoop u hiermede voldoende te hebben geïnformeerd om de beoordeling van dit projectvoorstel af te ronden.

Met vriendelijke groeten,

[Redacted signature]

Plv. verantwoordelijk onderzoeker

Viroclinics Biosciences B.V.
Rotterdam Science Tower
Marconistraat 16
3028 AK Rotterdam

[Redacted contact information]
[Redacted contact information]

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 20 augustus 2015 13:26
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Besluit aanvraag AVD905002015124
Bijlagen: Vergunning AVD905002015124.pdf; BXTAVD905002015124_2015_002dec_advies_.pdf; Beschikking aanvraag AVD905002015124 ondertekend.pdf

Geachte [REDACTED],

Op 14 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice' met aanvraagnummer AVD905002015124. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Zie bijgaande brief, de ondertekende beschikking is ook nog per post naar u toegezonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 20 augustus 2015 13:44
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: terugkoppeling aanvraag AVD905002015124

Geachte heer/mevrouw,

De DEC Consult heeft advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project 'Evaluation of Antiviral intervention strategies of Rabies in mice.' met aanvraagnummer AVD905002015124. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

Wij hebben nog een vraag aan de aanvrager gesteld m.b.t. het gebruik van beide geslachten in zijn project, en ook gevraagd om de NTS aan te passen op twee punten: het gemiddelde ongerief was "berekend", en dat is niet de bedoeling. De hoogste categorie ongerief moet worden vermeld, of de categorieën die bij de dierproeven horen en niet het individuele of gemiddelde ongerief. In dit geval is dat matig en ernstig. En 'wettelijk vereist onderzoek of routinematig productie' was niet aangekruist.

De aanvrager heeft zijn antwoord gemotiveerd m.b.t. de geslachten van de te gebruiken dieren, en een nieuwe versie van de NTS gestuurd.

Wij kunnen ons om onderstaande redenen niet volledig vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Een deel van het project is gericht op farmaca onderzoek (dierproeven 1 en 2) en een ander deel op het testen van vaccins (dierproeven 3 en 4). Wij zijn van mening dat er onvoldoende inhoudelijke samenhang is tussen deze twee afzonderlijke componenten. Wij vinden dat het project twee verschillende doelstellingen heeft die in twee aparte aanvragen moeten worden behandeld. Om deze reden zien wij deze aanvraag niet als een toetsbare eenheid. Om deze reden kan de aanvrager de dierproeven 1 en 2 onder deze vergunning uitvoeren, maar voor de dierproeven 3 en 4 moet hij/zij een aparte aanvraag indienen.

De CCD heeft besloten de vergunning gedeeltelijk te verlenen onder de volgende voorwaarden:

- 1) De aanvrager zal voor elke studie samen met de IvD het gebruik van dieren van beiden geslachten overwegen.
- 2) Indien later, in het kader van het project, proeven worden gedaan waarin aan de eisen van het wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie dient te worden voldaan, moet de aanvrager vooraf met de IvD afstemmen of er sprake van herhaling is.
- 3) In Artikel 10, eerste lid, onder a, Wet op de dierproeven, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij.

Overeenkomstig met uw advies is er een beoordeling achteraf vereist. Deze moet plaatst vinden binnen een jaar na afloop van het project, dus vóór 31 mei 2021.

De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.