

| Inventaris Wob-verzoek W16-11S | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
| | NTS2015329 | | | | | | | | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | |
| 2 | Projectvoorstel | | | x | | | | | |
| 3 | Niet-technische samenvatting | 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 | | | | | |
| 9 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | |
| 10 | Verzoek aanvulling aanvraag | | | | x | | x | x | |
| 11 | Reactie verzoek aanvulling | | | | x | | x | x | |
| 12 | Advies CCD | | x | | | | | | x |
| 13 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | |



30 NOV. 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> | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 <u>329</u> | <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt. | <table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>30275924</td></tr></table> | Naam instelling of organisatie | Universiteit Utrecht | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted] | KvK-nummer | 30275924 | | | | | | | | | | |
| Naam instelling of organisatie | Universiteit Utrecht | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KvK-nummer | 30275924 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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> | <table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>[Redacted] Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL27INGB0000425267</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table> | Straat en huisnummer | [Redacted] | Postbus | [Redacted] | Postcode en plaats | [Redacted] Utrecht | IBAN | NL27INGB0000425267 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Universiteit Utrecht | | | | | | |
| Straat en huisnummer | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Postbus | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Postcode en plaats | [Redacted] Utrecht | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IBAN | NL27INGB0000425267 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | Universiteit Utrecht | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | <table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table> | (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie | [Redacted] | | Afdeling | [Redacted] | | Telefoonnummer | [Redacted] | | E-mailadres | [Redacted] | | |
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Functie | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Afdeling | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Telefoonnummer | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E-mailadres | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. | <table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table> | (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie | [Redacted] | | Afdeling | [Redacted] | | Telefoonnummer | [Redacted] | | E-mailadres | [Redacted] | | |
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Functie | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Afdeling | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Telefoonnummer | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E-mailadres | [Redacted] | | | | | | | | | | | | | | | | | |

- 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 - 1 - 2016
- Einddatum 1 - 1 - 2018
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- DNA vaccinatie met nanopartikels
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- DNA vaccinatie met nanopartikels
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC
- Postadres
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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

Datum

Handtekening

Utrecht
 25-11-2015





Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

In 2008 is binnen het 3D drugs delivery programma van NanonextNL het project 03D.04 *DNA Vaccination by Polyplex-Tattooing: from bench to clinic* van start gegaan. Daarin werd toegewerkt naar de klinische applicatie van nanopartikels in DNA vaccinatie. Ondanks veelbelovende ex vivo resultaten die verkregen werden bij gebruik van poly(amidoamine) (PAA) polyplexen in tattooing van humane huid, bleek het door diverse omstandigheden lastig te zijn deze resultaten met voldoende voortgang te vertalen naar toepassing in de kliniek^{1,2}. De stap van proefdier naar patiënt bleek groter te zijn dan was geanticipeerd. De evaluatie van de vaccinatie resultaten die verkregen zijn in het project, gecombineerd met zeer recente nieuwe inzichten in het immunisatiemechanisme bij polyplex vaccinatie (zie verderop) en het beschikbaar komen van een nieuwe generatie zeer efficiënte PAA nanogelen voor DNA transfectie hebben geleid tot de conclusie dat er nog uitstekende mogelijkheden zijn om de eerder tegengekomen obstakels bij translatie van DNA vaccinatie via een nieuwe vaccinatie benadering en met behulp van de nieuwe PAA nanogelen te overwinnen. In de doorstart van het project worden op basis van bovenstaande uitgangspunten nieuwe nanopartikels voor DNA vaccinatie ontwikkeld. De doelstelling "from bench to clinic" wordt daarbij dichterbij gehaald door ons in eerste instantie te richten op veterinaire vaccinatie.

DNA vaccinatie

DNA vaccinatie in de huid is een nieuwe vaccinatie methode, waarbij met plasmide DNA (pDNA) cellen van een mens of dier tijdelijk worden getransfecteerd. Hierdoor ontstaat immuniteit tegen het eiwit dat op het pDNA gecodeerd is. Deze methode heeft veel voordelen boven conventionele vaccinatie met eiwit of geïnactiveerd virus : het is eenvoudig, er is geen injectienaald nodig voor de toediening in de huid, het pDNA is extreem lang houdbaar en de opgewekte immuniteit in proefdieren (muizen en apen) is robuust en zowel cellulair (Tcell inductie) als humoraal(antilichaam inductie). Helaas is de methode echter tot op heden niet succesvol in mensen^{3,4}.

Een van de redenen daarvoor is waarschijnlijk het grote verschil in de huidanatomie tussen proefdieren en mensen. Dit verschil leidt ertoe dat de transfectie-efficiëntie in de mensenhuid lager is dan in muizen. Bovendien kan het eiwit dat geproduceerd wordt in de getransfecteerde keratinocyten vermoedelijk minder goed uit de epidermis naar de lymfknoop komen omdat de nauwelijks behaarde mensenhuid 10x zo dik is als de sterk behaarde huid van muizen en apen. Daarom ligt het voor de hand om de technologie door te ontwikkelen in een proefdier model met een huidanatomie die vergelijkbaar is met mensen^{5,6,7}. Het varken biedt die mogelijkheid.

Ref.:

1. Bins AD, van den Berg JH, Oosterhuis K, Haanen JB. Recent advances towards the clinical application of DNA vaccines. *Neth J Med.* 2013 Apr;71(3):109-17.
2. van den Berg JH, Oosterhuis K, Schumacher TN, Haanen JB, Bins AD. Intradermal vaccination by DNA tattooing. *Methods Mol Biol.* 2014;1143:131-40. doi: 10.1007/978-1-4939-0410-5_9.
3. Eriksson F1, Tötterman T, Maltais AK, Pisa P, Yachnin J. DNA vaccine coding for the rhesus prostate specific antigen delivered by intradermal electroporation in patients with relapsed prostate cancer. *Vaccine.* 2013 Aug 20;31(37):3843-8.
4. Staff C, Mozaffari F, Haller BK, Wahren B, Liljefors M. A Phase I safety study of plasmid DNA immunization targeting carcinoembryonic antigen in

- colorectal cancer patients. Vaccine. 2011 Sep 9;29(39):6817-22. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.063. Epub 2010 Dec 30.
- Marquet F, Vu Manh TP, Maisonnasse P, Elhmouzi-Younes J, Urien C, Bouguyon E, Jouneau L, Bourge M, Simon G, Ezquerra A, Lecardonnel J, Bonneau M, Dalod M, Schwartz-Cornil I, Bertho N. Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human CD1a and CD14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T cell activation capacities. J Immunol. 2014 Dec 15;193(12):5883-93.
 - Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME, The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. Mol. Immunol. 2015 Jul;66(1):14-21.
 - Ploemen IH, Hirschberg HJ, Kraan H, Zeltner A, van Kuijk S, Lankveld DP, Royals M, Kersten GF, Amorij JP. Minipigs as an animal model for dermal vaccine delivery. Comp Med. 2014 Feb;64(1):50-4.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het hoofddoel van deze experimenten is het optimaliseren van een efficiënt dermaal DNA vaccin tegen HPV m.b.v. van het varken als diermodel. De experimenten zijn gericht op het optimaliseren van de verschillende stappen om uiteindelijk het meest effectieve vaccin incl. adjuvantia te selecteren. Met het varken als model verbetert maar verwachting de extrapolatie naar humaan.

Daarnaast heeft deze ontwikkeling van een dermale DNA vaccinatie methode in varkens commerciële zeer interessante toepassingsmogelijkheden. Virale infectieziekten zoals de varkensgriep zijn een aanhoudend probleem in de veehouderij en hoewel er een aantal vaccins beschikbaar zijn, is er veel ruimte voor verbetering; de bescherming van de huidige influenza vaccins is merendeel klinisch en de huidige vaccins geven geen vermindering van transmissie van veldvirus.

De projectgroep bestaat uit

- Prof Johan Engbertsen, TU Twente en CSO 20Med, verantwoordelijk voor de productie nanogelen
- Dr Sanne Samuels van het Nederlands Kanker Instituut, inhoudskundige tatoeage techniek
- Dr. Adriaan Bins, AMC
- Dr Gemma Kenter, AMC
- Dr. Arie van Nes, Specialist varkensgezondheid.

In het team zijn de verschillende aspecten van dit onderzoeksproject vertegenwoordigd, waardoor het project haalbaar moet zijn.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang: Het optimaliseren van de dermale DNA vaccinatie technologie voor toepassing in de menselijke huid, fundamenteel onderzoek, dat maatschappelijk van belang is. Daarnaast wordt als spin off de methode gebruikt om varkens door vaccinatie te beschermen tegen varkensgriep. Omdat de huidige methode van tatoeage is niet geschikt voor praktijkomstandigheden, zal – na gebleken effectiviteit - de toepasbaarheid van het ontwikkelde vaccin verder ontwikkeld dienen te worden.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Fase 0: Het ex-vivo testen van DNA vaccinatie op varkenshuid

Fase 1: Het bepalen van de meest optimale transfectie methode en de meest optimale nanopartikel formulering

Fase 2: Het bepalen van de meest optimale penetration enhancer

Fase 3: Het bepalen van CTL inductie en antilichaam inductie na toevoeging van adjuvantia

Fase 4: The proof of the pudding: Kan de optimale dermale DNA vaccinatie uit fase3 een beschermende immuunrespons induceren bij varkens met influenza als model virus.

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

In de eerste fase wordt met behulp van pDNA dat codeert voor luciferase de optimale transfectie methode en de optimale nanoparticle formulering bepaald voor transfectie van varkenshuid. Dit zijn snelle ex vivo proeven met pDNA dat codeert voor luciferase met een read-out op basis van luminiscentie metingen.

In de 2e fase wordt getest of met penetration enhancers de drainage naar de drainerende lymfknoop van het antigeen gecodeerd op het pDNA verbeterd kan worden. De hoeveelheid antigeen die uit de huid naar de lymfknoop draineert, wordt in dit model gemeten met een groen fluorescent model-antigeen, waarbij de drainage efficiëntie wordt uitgelezen door het kwantificeren van groen fluorescente antigeen presenterende cellen in de lymfknoop. Bij deze proeven worden varkens eenmalig gevaccineerd met de optimale methode uit fase1 en wordt na 3 dagen de lymfknoop geexcideerd voor analyse middels flow-cytometrie .

In de 3e fase worden varkens gevaccineerd met de optimale transfectie methode uit fase1 en de optimale penetratie enhancer uit fase2. Het pDNA codeert voor een preklinisch uitvoerig getest vaccin tegen HPV. In dit experiment wordt het effect van een aantal adjuvantia op de CTL inductie (uitgelezen met ELISPOT) en antilichaam inductie (uitgelezen met ELISA) vergeleken om zo een optimaal transdermaal adjuvans te definiëren. De optimale penetration enhancer en het adjuvans worden hierna als dat fysisch chemisch mogelijk is door 20Med geformuleerd in een slow-release pleister, om de toediening zo eenvoudig mogelijk te maken. Haemagglutinine zal toegevoegd worden om de respons hierop ook te bepalen in het kader van fase 4.

In de 4e fase worden een aantal dieren gevaccineerd met een pDNA dat codeert voor haemagglutinine (voor bescherming met antilichamen) en nucleoproteïnen (voor bescherming met Tcellen, omdat dit niet beïnvloed wordt door antigenic drift van het influenza virus) . Door middels DNA vaccinatie tegen deze antigenen te vaccineren wordt bovendien het glycosyleringspatroon van de antigenen in natuurlijke setting exact nagebootst. Hierdoor ontstaat naast cellulaire immuniteit ook optimale humorale immuniteit tegen relevante B cell epitopen. De effectiviteit van het vaccin wordt getest door challenge met een varkensinfluenza virus.

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

Flowchart voor DNA vaccinatie met nanopartikels

Fase 0: Testen van formuleringen van nanopartikels met DNA in varkenshuid. Hiertoe wordt huid van varkens gebruikt die in het kader van ander onderzoek of onderwijs geëuthanaseerd zijn.

Uitkomst: Met de huidige techniek van tatoeëren kunnen nanopartikels met DNA correct ingebracht worden en zichtbaar gemaakt worden.

Fase 1: Bepaling van de optimale transfectie methode en de optimale nanoparticle formulering.

Uitkomst: De formulering met de hoogste luminescentie gaat door.

Fase 2: Bepaling van de optimale penetration enhancer

Uitkomst: Analyse van de lymfeknoop d.m.v. flow cytometrie. De enhancer, die de grootste concentratie van groen fluorescente antigeen presenterende cellen in de lymfeknoop bewerkstelligt, gaat door.

Fase 3: Bepaling van het optimale transdermale adjuvans wat betreft CTL inductie vergeleken.

Uitkomst: Het adjuvans met de hoogste CTL inductie in combinatie met een goede humorale respons (HA) geeft gaat door.

Fase 4: Vaccinatie van varken met een pDNA dat codeert voor haemagglutinine (HA) en Nucleoproteinen met zowel een positieve als een negatieve controlegroep.

Uitkomstparameters: Inductie cellulaire immuniteit, humorale immuniteit en virusexcretie

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 1 | Fase 1 <i>optimalisatie van transfectie efficiëntie door middel van polyplexen</i> |
| 2 | Fase 2 <i>testen van de antigeen transfer van de huid naar de lymfknoop</i> |
| 3 | Fase 3 <i>locale adjuvantia voor optimale CTL inductie</i> |
| 4 | Fase 4 <i>Antilichaam en CTL inductie tegen varkens griep virus</i> |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 1 | <i>optimalisatie van transfectie efficiëntie door middel van polyplexen</i> |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

We gebruiken per experiment 4 varkens, waarbij de liezen en de oksels getatoeëerd worden met 4 verschillende formuleringen. Dit experiment wordt 4 maal herhaald teneinde de optimale formulering te vinden.

Op dag 1 en 2 wordt de huid geïnspecteerd, om een indicatie te krijgen van de toxiciteit.

Op dag 3 wordt het dier geëuthanaseerd, waarna de getatoeëerde huid wordt geëxideerd en op ijs naar het NKI vervoerd. Daar worden de samples direct ex vivo geïncubeerd in medium op 37C, waarna luciferine (het substraat voor luciferase) wordt toegevoegd aan het medium, zodat de luminescentie gemeten kan worden met behulp van de IVIS camera.

Met deze proefopzet worden 4 proeven gedaan, waarbij $3 \times 4 = 12$ polyplexen kunnen worden getest. In elk experiment wordt een controle meegenomen, zodat 3 nieuwe polyplexen per experiment kunnen worden getest.

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

Onder anaesthesie wordt de huid bij de oksels en de liezen een dier (van 20-30kg) voorbehandeld en getatoeëerd zoals hieronder beschreven. Er wordt voorbehandeld met depilatie creme (VEET) waaraan 2% w/w prilocaine is toegevoegd en 2% w/w lidocaine voor lokaal oppervlakkige anaesthesie effect. Deze crème wordt enkele minuten op de huid gehouden en daarna weggewassen met water.

Hierna wordt een tattoo van enkele cm^2 in beide oksels en beide liezen gezet, met pDNA:polyplex formulering in water. Het pDNA codeert voor luciferase van het vuurvliegje, gecloneerd in de pVAX backbone. Deze plasmide backbone wordt toegepast in humane trials en is zeer veilig gebleken. Er is geen risico op replicatie. Het bevat een kanamycine resistentiegen, een oriP, de CMV IE promoter en een BGH polyA tail.

Voor dit experiment wordt het pDNA geformuleerd in polyplexen. Hierdoor verandert de lading en wordt de opname door keratinocyten efficiënter. Dit leidt uiteindelijk tot efficiëntere transfectie en daardoor een hogere luciferase productie. Er worden 4 formuleringen getest in quadriplo. Hiervoor worden dus in totaal 16 tattoos gezet. Elk van **de 4 dieren** krijgt van elke formulering 1 tattoo. Elk dier krijgt op dag 0 in 1 sessie dus 4 tattoos: in de linker en rechter oksel, en in de linker en rechter lies. De behandelduur per dier voor de voorbehandeling en het zetten van de tattoos is ongeveer een half uur.

Op dag 1 en 2 wordt de huid geïnspecteerd, om een indicatie te krijgen van de toxiciteit. Er wordt geen toxiciteit verwacht, op basis van fase1 trial data in mensen.

Op dag 3 wordt het dier geëuthanaseerd, waarna de getatoeëerde huid wordt geëxideerd en op ijs naar het NKI vervoerd. Daar worden de samples direct ex vivo geïncubeerd in medium op 37C, waarna luciferine (het substraat voor luciferase) wordt toegevoegd aan het medium, zodat de luminescentie gemeten kan worden met behulp van de IVIS camera.

Met deze proefopzet worden 4 proeven gedaan, waarbij $3 \times 4 = 12$ polyplexen kunnen worden getest. In elk experiment wordt een controle meegenomen, zodat 3 nieuwe polyplexen per experiment kunnen worden getest.

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

Per dier worden 4 formuleringen getest, de 4 formuleringen worden bij elk varken op een andere locatie getest, zodat we geen invloed van de locatie op het dier hebben.

Het aantal fotonen wordt gemeten met de IVIS camera. We verwachten dat varkens op eenzelfde manier zullen reageren als muizen. Bij een imaging tijd van 30" en een tattoo van 45s in muizen is de sigma hiervan ongeveer 10000 fotonen. Bij een sample size van 4 wordt de standard error of the mean $10000/\sqrt{4} = 5000$.

Hiermee kunnen we verschillen van 10150 fotonen met een power van 95% aantonen. Een kleiner verschil is niet interessant.

B. De dieren

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

Varkens, afkomstig van een erkende leverancier (De Tolakker), 16 dieren van 20-30 kg (9-10 weken oud), geslacht niet van belang

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

We proberen tijdens de eerste fasen van de proeven een aantal variabelen uit opdat we in de laatste fase met het optimale product de challenge doen. Daardoor worden minder dieren gebruikt dan wanneer voor iedere formulering een fase 4 experiment gedaan wordt. Er zijn reeds ervaringen in muizen doch dit diermodel is niet voldoende voorspellend voor de mens. Daarnaast hebben we in fase 0 de techniek reeds geoptimaliseerd op de huid van in ander kader gedode varkens. Daarnaast proberen we om de invloed van lokalisatie op het dier te kwantificeren en dus ook te minimaliseren door 4 monsters op een dier te testen en elk monster op de verschillende lokalisaties op het dier. Verder is uiteindelijk het varken ook doeldier.

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

We gebruiken algehele en lokale anaesthesie bij het tatoeëren bij de toepassing van VEET wordt ook een lokaal anaestheticum gebruikt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De dieren worden onder lokale analgesie getatoeëerd. Na de tatoeage wordt ingeschat aan de hand van humane ervaringen dat pijnbestrijding niet noodzakelijk is, De dieren worden gesedeerd alvorens ze met een overdosis barbituraat geëuthanaseerd worden

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Humaan eindpunt

Een dierproef brengt met zich mee dat dieren tijdens het experiment onaanvaardbaar lijden en dat ze geëuthanaseerd dienen te worden, het zgn. humaan eindpunt. In deze bijlage zijn de criteria voor het humane eindpunt geformuleerd.

Gehanteerde criteria ten aanzien van dierwelzijn en humaan eindpunt

- Een van de belangrijke doelen voor het experiment is de follow-up van de dieren. Medicatie kan het ziekteverloop en de uitkomst van het experiment beïnvloeden en vanuit dit oogpunt wordt daar terughoudend mee omgegaan. Wanneer er naar het oordeel van de verantwoordelijke dierenarts pijnstilling nodig is en dit niet strijdig is met de doelstelling van het experiment, wordt dit echter altijd toegediend.
- Humaan eindpunt: wanneer het lijden van een dier niet langer opweegt tegen het nut dat dit dier voor het onderzoek heeft, wordt het dier eerder geëuthanaseerd.
- Indien het dier een ernstige mate van ongerief heeft, wordt deze geëuthanaseerd.

Criteria:

Doel van het formuleren van deze criteria is het nauwkeurig vastleggen van het “vroegste” eindpunt.

De volgende criteria worden gehanteerd:

1. Algemene criteria:

- a. Het ‘Analogieprincipe’
- b. Het voorkomen van spontaan dood gaan/ernstige pijn
- c. Het minimaliseren van de duur van ongerief

2. Specifieke criteria (mede op basis van het uitgevoerde klinisch onderzoek, observaties, verslaglegging & monitoring):

De varkens krijgen, indien er verschijnselen van pijn waargenomen worden, adequate pijnstilling toegediend. Een varken heeft een drive om te eten en drinken, derhalve is het belangrijkste criterium om varkens te euthanaseren:

- niet meer eten en/of drinken: Als een varken stopt met eten en drinken, dan is het varken lijdende.
- sterk vermageren (in de tijd; monitoring BCS/ \pm 20% verlies in 2 dagen)
- duidelijke pijngeluiden (tandenknarsen, kreunen)
- sterk verhoogde pols en ademhaling t.g.v. hevige benauwdheid
- wanneer het niet mogelijk blijkt de verschijnselen van pijn d.m.v. pijnstilling weg te nemen

3. Omdat het gaat om individuele dieren die ziektebeelden in verschillende gradaties kunnen ontwikkelen, zal voor elk dier opnieuw deze afweging gemaakt moeten worden. De verantwoordelijkheid hiervoor ligt altijd bij de begeleidende dierenarts.

4. Als het varken niet meer functioneel is in het onderzoek, zelfs als het dier gering lijdt, wordt deze geëuthanaseerd.

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

Op basis van de experimenten verwachten wij niet dat deze HEP's gehaald worden.

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van

'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Vanwege de kortdurende anaesthesie: Licht. De tatoeage is onder anaesthesie (lokaal en algeheel) en er is geen pijn te verwachten na de behandeling.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De huid is nodig voor analyse resultaten

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 2 | <i>testen van de antigen transfer van de huid naar de lymfknoop</i> |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De 1e proef in deze fase is om te testen of het 'antigeen-transfer-model' werkt in varkens en wordt als volgt opgezet: Er worden in elk van 4 varkens 4 tattoos gezet, in de beide liezen en beide oksels. De lokalisatie verschilt per dier zodanig dat elk preparaat op elke lokalisatie aangebracht wordt. Hiervoor worden 4 parameters getest op dezelfde manier als beschreven voor fase1. Als bij 1 van de 4 geteste condities zsgreen positieve APCs in de DLN kunnen worden gedetecteerd, wordt met die conditie als controle nog een drietal extra parameters getest in een identiek opgezette proef met 4 dieren.

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

Onder anaesthesie en lokale analgesie (in de depilatiecreme) wordt de huid bij de oksels en de liezen een dier (van 20-30kg) voorbehandeld

en getatoeëerd zoals hieronder beschreven. Er wordt voorbehandeld met depilatie creme (VEET) waaraan 2% w/w prilocaine is toegevoegd en 2% w/w lidocaine voor lokale anaesthesie. Deze crème wordt enkele minuten op de huid gehouden en daarna weggewassen met water.

Voor dit deel van het project wordt getatoeëerd met pDNA geformuleerd in polyplexen op de manier die in fase1 de hoogste expressie liet zien.

Het pDNA in deze fase codeert voor een groen fluorescent eiwit, te weten zsGreen. De backbone van het plasmide is wederom pVAX. Het zsGreen is licht gemodificeerd. Er is namelijk een gecombineerde palmitoylatie / myristoylatie tag aan de N-terminus gezet, waardoor het zsGreen eiwit naar de lipide bimembranen wordt getarget. In muizen kan na een tattoo dit 'pamyr-zsGreen' eiwit dmv flow-cytometrie in antigeen presenterende cellen (APCs) in de drainerende lymfknoop gedetecteerd worden. Het aantal zsGreen positieve APC's geeft een indicatie van de efficiëntie van de transfer van het antigeen van de huid naar de DLN. Het doel van deze fase is om te kijken of dit ook in varkens lukt. Als dat inderdaad lukt dan worden vervolgens extra modificaties getest in het tattoo protocol waarmee de antigen transfer van het eiwit mogelijk verbetert.

De 1e proef in deze fase is om te testen of het 'antigeen-transfer-model' werkt in varkens en wordt als volgt opgezet: Er worden in elk van 4 varkens 4 tattoos gezet, in de beide liezen en beide oksels. Hiervoor worden 4 parameters getest op dezelfde manier als beschreven voor fase1:

geen penetration enhancer

occlusie onder huishoudfolie

verlengde VEET behandeling en occlusie

verlengde VEET behandeling, occlusie en DMSO creme

Als bij 1 van de 4 geteste condities zsGreen positieve APCs in de DLN kunnen worden gedetecteerd, wordt met die conditie als controle nog een drietal extra parameters getest in een identiek opgezette proef met 4 dieren., Getest worden: lemonene, chloroform/methanoloplossing en als laatste een dubbele verlengde voorbehandeling met VEET. Dit alles gebeurt met adequate pijnstilling.

Op dag 1 en 2 wordt de huid geïnspecteerd, om een indicatie te krijgen van de toxiciteit. Er wordt geen toxiciteit verwacht. Alle aanvullende handelingen zijn standaard in de humane dermatologie.

Op dag 3 wordt elk dier geëuthanaseerd, waarna de drainerende lymfknoopen worden geexcideerd en op ijs naar het NKI worden vervoerd. Daar worden de samples direct ex vivo opgewerkt voor flow-cytometrie en geanalyseerd.

De varkens worden beperkt (d.w.z. bijna adlib) gevoerd, waarbij voeropname en wateropname gescoord worden om een indicatie te krijgen voor de systemische toxiciteit. Daarnaast zal een klinische score uiteraard onderdeel uitmaken van het bepalen van systemische toxiciteit. De ervaring met challenge-experimenten leert dat varken minder eten wanneer ze ziek worden. De verwachting is dat dit niet zal gebeuren in dit experiment, ondanks het feit dat antigenen wel zeer beperkt systemisch zouden kunnen worden of de interferonen/interleukines, die gevormd kunnen worden. Lokale toxiciteit wordt klinisch gescoord door inspectie van de behandelde huid.

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

Het aantal van 4 waarnemingen komt uit proeven met muizen, en we verwachten dat varkens op eenzelfde manier zullen reageren als muizen. De sigma van de entiteit ' absoluut aantal groene cellen in de DLN' voor de fase 2 proeven is 200

Met een sample size van 4 dieren is de standard error $200/\sqrt{4} = 100$

Met deze sample size kunnen we dan met 95% power een verschil van 203 (2.03x standard error of the mean) groene cellen aantonen. Een kleiner verschil is niet interessant.

B. De dieren

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

Varkens, afkomstig van een erkende leverancier (De Tolakker), 12 dieren van 20-30 kg (9-10 weken oud), geslacht niet van belang

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

We proberen tijdens de eerste fasen van de proeven een aantal variabelen uit opdat we in de laatste fase met het optimale product de challenge doen. Daardoor worden minder dieren gebruikt dan wanneer voor iedere formulering een fase 4 experiment gedaan wordt. Er zijn reeds ervaringen in muizen doch dit diermodel is niet voldoende voorspellend voor de mens. Daarnaast hebben we in fase 0 de techniek reeds geoptimaliseerd op de huid van in ander kader gedode varkens. Daarnaast proberen we om de invloed van lokalisatie op het dier te kwantificeren en dus ook te minimaliseren door 4 monsters op een dier te testen en elk monster op de verschillende lokalisaties op het dier. Verder is uiteindelijk het varken ook doeldier.

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

We gebruiken algehele anaesthesie bij het tatoeëren bij de toepassing van VEET wordt bovendien een lokaal anaestheticum gebruikt

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

X Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

x Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De dieren worden getatoeerd onder lokale analgesie. Bij de toepassing van VEET wordt ook een lokaal anaestheticum toegevoegd. De dieren worden gesedeerd alvorens ze met een overdosis barbituraat geëuthanaseerd worden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Humaan eindpunt

Een dierproef brengt met zich mee dat dieren tijdens het experiment onaanvaardbaar lijden en dat ze geëuthanaseerd dienen te worden, het zgn. humaan eindpunt. In deze bijlage zijn de criteria voor het humane eindpunt geformuleerd.

Gehanteerde criteria ten aanzien van dierwelzijn en humaan eindpunt

- Een van de belangrijke doelen voor het experiment is de follow-up van de dieren. Medicatie kan het ziekteverloop en de uitkomst van het experiment beïnvloeden en vanuit dit oogpunt wordt daar terughoudend mee omgegaan. Wanneer er naar het oordeel van de verantwoordelijke dierenarts pijnstilling nodig is en dit niet strijdig is met de doelstelling van het experiment, wordt dit echter altijd toegediend.
- Humaan eindpunt: wanneer het lijden van een dier niet langer opweegt tegen het nut dat dit dier voor het onderzoek heeft, wordt het dier eerder geëuthanaseerd.
- Indien het dier een ernstige mate van ongerief heeft, wordt deze geëuthanaseerd.

Criteria:

Doel van het formuleren van deze criteria is het nauwkeurig vastleggen van het “vroegste” eindpunt.

De volgende criteria worden gehanteerd:

1. Algemene criteria:

- a. Het ‘Analogieprincipe’
- b. Het voorkomen van spontaan dood gaan/ernstige pijn
- c. Het minimaliseren van de duur van ongerief

2. Specifieke criteria (mede op basis van het uitgevoerde klinisch onderzoek, observaties, verslaglegging & monitoring):

De varkens krijgen, indien er verschijnselen van pijn waargenomen worden, adequate pijnstilling toegediend. Een varken heeft een drive om te eten en drinken, derhalve is het belangrijkste criterium om varkens te euthanaseren:

- niet meer eten en/of drinken: Als een varken stopt met eten en drinken, dan is het varken lijdende.
- sterk vermageren (in de tijd; monitoring BCS/ \pm 20% verlies in 2 dagen)
- duidelijke pijngeluiden (tandenknarsen, kreunen)
- sterk verhoogde pols en ademhaling t.g.v. hevige benauwdheid
- wanneer het niet mogelijk blijkt de verschijnselen van pijn d.m.v. pijnstilling weg te nemen

3. Omdat het gaat om individuele dieren die ziektebeelden in verschillende gradaties kunnen ontwikkelen, zal voor elk dier opnieuw deze afweging gemaakt moeten worden. De verantwoordelijkheid hiervoor ligt altijd bij de begeleidende dierenarts.

Als het varken niet meer functioneel is in het onderzoek, zelfs als het dier gering lijdt, wordt deze geëuthanaseerd.

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

Op basis van de experimenten verwachten wij niet dat deze HEP's gehaald worden

K. Classificatie van ongerief

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

Vanwege de kortdurende anaesthesie: Licht. De tatoeage is onder anaesthesie (lokaal en algeheel) en er is geen pijn te verwachten na de behandeling.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De huid en de lymfknoopen die het gebied draineren zijn nodig voor analyse resultaten

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="3"/> | <input type="text" value="locale adjuvantia voor optimale CTL inductie"/> |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor deze fase wordt het DNA tattoo protocol aangepast, waarbij getatoeëerd wordt met een nabehandeling en voorbehandeling, die leidt tot optimale antigeen transfer, op basis van de bovenbeschreven proeven. In fase3 wordt gezocht naar adjuvantia, waarmee door middel van verbeterde APC-maturatie de priming van vaccin-specifieke CTL kan worden verbeterd. Onze ervaring in muizen is dat dit nauwelijks invloed heeft op de antilichaam respons. Het doel hierbij is om een dermate goede CTL inductie te bewerkstelligen dat de CTL direct ex vivo in perifeer bloed kunnen worden gedetecteerd met ELISPOT, zodat we het beste adjuvant eenvoudig kunnen kiezen. Tevens zal in fase 3 ook een Haemagglutinine toegevoegd worden om de optimale combinatie voor fase 4.

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

In deze fase vaccineren we met het beste DNA vaccin dat we hebben in muizen: een pDNA dat codeert voor de geïnactiveerde E6 and E7 antigenen van het HPV virusserotype 16. Er is aan de N-terminus een stuk van het tetanus toxine toegevoegd en verder zit er een signaal peptide aan de N-terminus en een KDEL sequentie aan de C-terminus en het haemagglutinine voor fase 4. Dit zijn door trial and error gevonden aanpassingen die de CTL inductie in muizen verbeteren. Opmerkelijk is dat ze voor andere antigenen niet helpen, maar voor dit E6-E7 vaccin wel.

Dit experiment bestaat uit 3 groepen van 3 dieren in een groep, die elk 2-maal worden gevaccineerd met het E6-E7vaccin, met een interval van 2 weken. Voor start van de vaccinatie, op moment van de tweede vaccinatie en op dag 7, dag 14 en dag 21 na de 2e vaccinatie wordt perifeer bloed afgenomen, wat wordt geanalyseerd in het NKI voor CTL inductie en op antilichamen voor HA. In elk van de 3 groepen wordt een adjuvant getest, dat geselecteerd is op basis van werkzaamheid in muizen en op basis van praktische toepasbaarheid. In groep 1 wordt geen adjuvant gebruikt. In groep 2 wordt een pDNA dat codeert voor een fragment van flagelline van Salmonella typhimurum toegevoegd aan het E6-E7 DNA vaccin. In groep 3 wordt een subcutaan depot met gardiquimod (een synthetisch TLR7 ligand) in IFA gespoten onder de getatoeëerde huid, 1 dag na elk van de 2 vaccinaties.

Deze proef wordt of herhaald in dezelfde opzet met het nanopartikel dat in fase2 als op een na beste testte, in identieke opzet als hierboven beschreven, of als 1 van deze adjuvantia de respons significant verbetert, wordt een extra experiment gedaan waarbij het meest werkzame adjuvant wordt geformuleerd voor transcutane slow-release toediening door 20Med. In het geval het pDNA dat codeert voor flagelline de CTL inductie verbetert (en verder geen van de adjuvantia) is dit natuurlijk niet nodig. In deze proef wordt een controle groep zonder penetration enhancer of adjuvant, een controle groep met penetration enhancer zonder adjuvant, en de experimentele groep, met penetration enhancer en transdermaal adjuvant getest. Dit gebeurt in de 3x3opzet, met vaccinatie op d0 en d14.

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

Het aantal van 3 waarnemingen komt uit proeven met muizen. De sigma van de entiteit 'absoluut aantal groene cellen in de DLN' voor de fase 2 proeven is 200

Met een sample size van 3 dieren is de standard error $200/\sqrt{3} = 115$

Met deze sample size kunnen we dan met 95% power een verschil van 234 (2.03x standard error of the mean) groene cellen aantonen. Een kleiner verschil is niet interessant.

B. De dieren

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

Varkens, afkomstig van een erkende leverancier (De Tolakker), 18 dieren van 20-30 kg (9-10 weken oud), geslacht niet van belang

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

We proberen tijdens de eerste fasen van de proeven een aantal variabelen uit opdat we in de laatste fase met het optimale product de challenge doen. Daardoor worden minder dieren gebruikt dan wanneer voor iedere formulering een fase 4 experiment gedaan wordt. Er zijn reeds ervaringen in muizen doch dit diermodel is niet voldoende voorspellend voor de mens. Daarnaast hebben we in fase 0 de techniek reeds geoptimaliseerd op de huid van in ander kader gedode varkens. Daarnaast proberen we om de invloed van lokalisatie op het dier te kwantificeren en dus ook te minimaliseren door 4 monsters op een dier te testen en elk monster op de verschillende lokalisaties op het dier. Verder is uiteindelijk het varken ook doeldier.

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

We gebruiken algehele anaesthesie bij het tatoeëren bij de toepassing van VEET wordt bovendien een lokaal anaestheticum gebruikt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De dieren worden onder lokale en algehele anaesthesie getatoeerd. Ook bij toepassing van VEET wordt lokale anaesthesie toegepast. De dieren worden gesedeerd alvorens ze met een overdosis barbituraat geëuthanaseerd worden

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Op grond van 'lange peptide' vaccinatie studies, met IFA en adjuvantia, uitgevoerd in Leiden worden geen granulomen verwacht, wel steriele infiltraten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Humaan eindpunt

Een dierproef brengt met zich mee dat dieren tijdens het experiment onaanvaardbaar lijden en dat ze geëuthanaseerd dienen te worden, het zgn. humaan eindpunt. In deze bijlage zijn de criteria voor het humane eindpunt geformuleerd.

Gehanteerde criteria ten aanzien van dierwelzijn en humaan eindpunt

- Een van de belangrijke doelen voor het experiment is de follow-up van de dieren. Medicatie kan het ziekteverloop en de uitkomst van het experiment beïnvloeden en vanuit dit oogpunt wordt daar terughoudend mee omgegaan. Wanneer er naar het oordeel van de verantwoordelijke dierenarts pijnstilling nodig is en dit niet strijdig is met de doelstelling van het experiment, wordt dit echter altijd toegediend.
- Humaan eindpunt: wanneer het lijden van een dier niet langer opweegt tegen het nut dat dit dier voor het onderzoek heeft, wordt het dier eerder geëuthanaseerd.

- Indien het dier een ernstige mate van ongerief heeft, wordt deze geëuthanaseerd.

Criteria:

Doel van het formuleren van deze criteria is het nauwkeurig vastleggen van het “vroegste” eindpunt.

De volgende criteria worden gehanteerd:

1. Algemene criteria:

- a. Het ‘Analogieprincipe’
- b. Het voorkomen van spontaan dood gaan/ernstige pijn
- c. Het minimaliseren van de duur van ongerief

2. Specifieke criteria (mede op basis van het uitgevoerde klinisch onderzoek, observaties, verslaglegging & monitoring):

De varkens krijgen, indien er verschijnselen van pijn waargenomen worden, adequate pijnstilling toegediend. Een varken heeft een drive om te eten en drinken, derhalve is het belangrijkste criterium om varkens te euthanaseren:

- niet meer eten en/of drinken: Als een varken stopt met eten en drinken, dan is het varken lijdende.
- sterk vermageren (in de tijd; monitoring BCS/ \pm 20% verlies in 2 dagen)
- duidelijke pijngeluiden (tandenknarsen, kreunen)
- sterk verhoogde pols en ademhaling t.g.v. hevige benauwdheid
- wanneer het niet mogelijk blijkt de verschijnselen van pijn d.m.v. pijnstilling weg te nemen

3. Omdat het gaat om individuele dieren die ziektebeelden in verschillende gradaties kunnen ontwikkelen, zal voor elk dier opnieuw deze afweging gemaakt moeten worden. De verantwoordelijkheid hiervoor ligt altijd bij de begeleidende dierenarts.

4. Als het varken niet meer functioneel is in het onderzoek, zelfs als het dier gering lijdt, wordt deze geëuthanaseerd.

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

Op basis van de experimenten verwachten wij niet dat deze HEP's gehaald worden.

K. Classificatie van ongerief

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

Vanwege de kortdurende anaesthesie: Licht. De tatoeage is onder anaesthesie (lokaal en algeheel) en er is geen pijn te verwachten na de behandeling.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De huid en de lymfknoopen die het gebied draineren zijn nodig voor analyse resultaten

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

| | | | |
|-----|--|----------------------|--|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 10800 | |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Utrecht | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | | 4 | <i>Antilichaam en CTL inductie tegen varkens griep virus</i> |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In deze proef wordt gevaccineerd volgens een regime waarbij de voor- en nabehandeling na elke tattoo verder is aangepast op basis van de proeven in fase3, namelijk met toevoeging van het best werkende adjuvant, idealiter in transdermale formulering en toegepast voor bescherming tegen influenza.

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

Er wordt in deze proef in eerste instantie getest of vaccinatie met pDNA dat codeert voor zowel haemaglutinine als Nucleoproteine (van een varkensinfluenza strain naar keuze) antilichamen en CTL induceert.

Hiervoor worden 6 dieren met leeg pVAX gevaccineerd , 6 dieren met pVAX dat codeert voor antigenen van het pathoogeen, 6 dieren met een

commercieel beschikbaar controle vaccin en 6 dieren niet gevaccineerd. Na de 2 tattoos (met een interval van 2 weken) wordt op dag 7,14 en 21 na de laatste tattoo PBL afgenomen voor CTL analyse en haemagglutinaties essays. Hierna worden de dieren een maand op stal gelaten. Daarna worden ze intranasaal gechallenged met de corresponderende influenza strain. Het eindpunt bestaat uit keelwabs voor viral load, klinische symptoom scores en serologie, waarna de dieren worden geëuthanaseerd.

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

De opzet is analoog aan de publicatie van Loeffen WL, de Vries RP, Stockhofe N, van Zoelen-Bos D, Maas R, Koch G, Moormann RJ, Rottier PJ, de Haan CA. Vaccination with a soluble recombinant hemagglutinin trimer protects pigs against a challenge with pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. *Vaccine*. 2011 Feb 11;29(8):1545-50. Het verschil in virusexcretie is zodanig dat 6 dieren per groep voldoende moeten zijn.

B. De dieren

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

Varkens, afkomstig van een erkende leverancier (De Tolakker), 24 dieren van 20-30 kg (9-10 weken oud), geslacht niet van belang

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

We proberen tijdens de eerste fasen van de proeven een aantal variabelen uit opdat we in de laatste fase met het optimale product de challenge doen. Daardoor worden minder dieren gebruikt dan wanneer voor iedere formulering een fase 4 experiment gedaan wordt. Er zijn reeds ervaringen in muizen doch dit diermodel is niet voldoende voorspellend voor de mens. Daarnaast hebben we in fase 0 de techniek reeds geoptimaliseerd op de huid van in ander kader gedode varkens. Verder is uiteindelijk het varken ook doeldier. Gezien de resultaten van Loeffen et al. 2011 zouden in dit onderdeel 6 dieren per groep voldoende moeten zijn om evt verschillen aan te tonen.

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

We gebruiken algehele anaesthesie bij het tatoeëren bij de toepassing van VEET wordt bovendien een lokaal anaestheticum gebruikt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De dieren worden onder lokale en algehele anaesthesie getatoeerd. De dieren worden gesedeerd alvorens ze met een overdosis barbituraat geethanaseerd worden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De anaesthesie geeft lichte welzijnsaantasting, de challenge met influenza-virus kan, zeker bij de niet gevaccineerde controledieren matig ongerief tot gevolg hebben.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Humaan eindpunt

Een dierproef brengt met zich mee dat dieren tijdens het experiment onaanvaardbaar lijden en dat ze geëuthanaseerd dienen te worden, het zgn. humaan eindpunt. In deze bijlage zijn de criteria voor het humane eindpunt geformuleerd.

Gehanteerde criteria ten aanzien van dierwelzijn en humaan eindpunt

- Een van de belangrijke doelen voor het experiment is de follow-up van de dieren. Medicatie kan het ziekteverloop en de uitkomst van het experiment beïnvloeden en vanuit dit oogpunt wordt daar terughoudend mee omgegaan. Wanneer er naar het oordeel van de verantwoordelijke dierenarts pijnstilling nodig is en dit niet strijdig is met de doelstelling van het experiment, wordt dit echter altijd toegediend.
- Humaan eindpunt: wanneer het lijden van een dier niet langer opweegt tegen het nut dat dit dier voor het onderzoek heeft, wordt het dier eerder geëuthanaseerd.
- Indien het dier een ernstige mate van ongerief heeft, wordt deze geëuthanaseerd.

Criteria:

Doel van het formuleren van deze criteria is het nauwkeurig vastleggen van het “vroegste” eindpunt.

De volgende criteria worden gehanteerd:

1. Algemene criteria:

- a. Het ‘Analogieprincipe’
- b. Het voorkomen van spontaan dood gaan/ernstige pijn
- c. Het minimaliseren van de duur van ongerief

2. Specifieke criteria (mede op basis van het uitgevoerde klinisch onderzoek, observaties, verslaglegging & monitoring):

De varkens krijgen, indien er verschijnselen van pijn waargenomen worden, adequate pijnstilling toegediend. Een varken heeft een drive om te eten en drinken, derhalve is het belangrijkste criterium om varkens te euthanaseren:

- niet meer eten en/of drinken: Als een varken stopt met eten en drinken, dan is het varken lijdende.

- sterk vermageren (in de tijd; monitoring BCS/± 20% verlies in 2 dagen)
- duidelijke pijngeluiden (tandenknarsen, kreunen)
- sterk verhoogde pols en ademhaling t.g.v. hevige benauwdheid
- wanneer het niet mogelijk blijkt de verschijnselen van pijn d.m.v. pijnstilling weg te nemen

3. Omdat het gaat om individuele dieren die ziektebeelden in verschillende gradaties kunnen ontwikkelen, zal voor elk dier opnieuw deze afweging gemaakt moeten worden. De verantwoordelijkheid hiervoor ligt altijd bij de begeleidende dierenarts.

4. Als het varken niet meer functioneel is in het onderzoek, zelfs als het dier gering lijdt, wordt deze geëuthanaseerd.

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

Op basis van de experimenten verwachten wij niet dat deze HEP's gehaald worden, ook niet na challenge van ongevaccineerde dieren.

K. Classificatie van ongerief

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

De anaesthesie geeft lichte welzijnsaantasting, de challenge met influenza-virus kan, zeker bij de niet gevaccineerde controledieren matig ongerief tot gevolg hebben. Dus voor het geheel matig ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

De huid en de lymfknoopen die het gebied draineren zijn nodig voor analyse resultaten

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.803.013
2. Titel van het project : DNA vaccinatie met nanopartikels
3. Titel van de NTS : Een nieuwe vaccinatiemethode bij varkens en mensen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 01-07-2015
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 08-07-2015 en 23-09-2015
 anderszins behandeld: per email: 12-10-2015
 termijnonderbreking(en) van / tot : 14-07-2015 tot 10-09-2015
30-09-2015 tot 09-10-2015

- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 17-11-2015

7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 23-09-2015
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 7 DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: Aanvrager Dierenarts en de Klinisch Oncoloog Internist
- Strekking van de vragen:
 - Wat is precies het doel van de studie?
 - Waarop berust de keuze voor het gebruik van influenza?
- Strekking van de antwoorden:
 - Het doel wordt als volgt toegelicht: de clinicus licht toe dat er bij de mens grote behoefte is aan een vaccinatiemethode die T-cel cytotoxie (cellulaire immuniteit) induceert. Hij heeft daartoe hoge verwachtingen van DNA-vaccinatie met de tattooetechniek en heeft daarom met een varkensspecialist contact gezocht om een en ander nader uit te zoeken in het varkensmodel, omdat de huid van het varken

sterk overeenkomt met de huid van de mens. Voor beide partners in dit projectvoorstel is de preklinische studie naar optimale transfectie methode, penetratie enhancer en bepaling van de inductie van cellulaire en humorale immuniteit (bijlagen 1 t/m 3) van belang. In bijlage 4 wordt een challenge met influenza uitgevoerd om de werkzaamheid van de vaccinatie te testen in het doeldier het varken. Dit onderdeel is van belang voor de diergeneeskunde. De varkenshuid lijkt veel op de mensenhuid, daarna komt de huid van naakte cavia's in de buurt. Voor het verder ontwikkelen van de tattoo methode voor toepassing bij de mens zal METC-goedkeuring nodig zijn.

- Voor wat betreft de keuze van het influenzavirus wordt toegelicht dat bij gebruik van NP T-cel immuniteit wordt geïnduceerd en ook antilichamen. Als dit model een goede T-cel functie kan induceren dan is de verwachting dat ook een goede humorale immuniteit wordt gegenereerd. De noodzaak van het kunnen beschikken over een goed vaccin tegen influenza bij varkens en bijbehorende vaccinatiemethode is toegelicht en is evident.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 14-07-2015 en 30-09-2015 en 16-10-2015
- Datum: 14-07-2015
- Strekking van de vragen:
- NTS 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: Voor de controlegroep kan deze regel niet gelden. De DEC verzoekt u ook een regel te schrijven voor deze groep.
- Projectvoorstel 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af of deze vorm van behandeling toepasbaar zal worden in de varkensindustrie, vanwege de tijd die het kost. Graag uw visie hierop. Tevens graag toelichten hoe het tatoeëren in de praktijk gaat.
- 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af hoe de translatie naar de mens is. Graag beter onderbouwen waarom de huid van een varken vergelijkbaar is met die van de mens met betrekking tot deze methode, waarbij u ook aandacht besteedt aan mogelijke verschillen in anatomie en fysiologie
- 3.1 Achtergrond: U noemt onder meer dat het een voordeel is dat er cellulaire immuniteit ontstaat. Echter, bij influenza is met name humorale immuniteit belangrijk. De DEC vraagt zich daarom af waarom u zich in uw onderzoek niet richt op een ander, voor het varken relevant, viraal vaccin waarbij cellulaire afweer nodig is.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Met betrekking tot fase 3 merkt de DEC wederom op dat er bij influenza met name gekeken moet worden naar humorale immuniteit, in plaats van cellulaire immuniteit. Daarbij zijn adjuvantia die leiden tot optimale cellulaire immuniteit mogelijk niet het beste voor de inductie van antilichamen tegen HA. Graag toelichten.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Het is de DEC niet duidelijk waarom u niet dezelfde vectoren gebruikt in fase 3 en 4, bijvoorbeeld HA en NP in plaats van HA en NA. Graag toelichten en noemen of u nu NP of NA test.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC wijst u erop dat er op de dag van de challenge ook bloed moet worden afgenomen om naar HA titers te kunnen kijken. Graag toevoegen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: U spreekt over neuramidase. Dit moet neuraminidase zijn. Graag aanpassen.
- Bijlage 2 A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het bepalen van systemische toxiciteit door de voeropname te meten is onvoldoende. De DEC verzoekt u daarom een andere methode hiervoor te kiezen. Daarbij vraagt de DEC zich af waarom de dieren beperkt gevoerd worden. Graag toelichten.
- Bijlage 4 B. De dieren: U noemt dat de varkens worden geselecteerd op basis van MHC-type. De DEC vraagt zich af of dat nodig is, hoe u dit doet en wat deze geselecteerde groep betekent voor wat u wilt bereiken. Graag toelichten.
- Datum antwoord: 10-09-2015
- Strekking van de antwoorden:
- Niet technische samenvatting: regel toegevoegd.
- 3.1 toepassing in de varkensindustrie: Een directe toepassing op deze manier zien we nog niet, we staan slechts aan het begin van een evt. ontwikkeling.
- 3.1 Literatuur toegevoegd aangaande de overeenkomst humane huid-varkenshuid: Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME, The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. Mol. Immunol. 2015 Jul;66(1):14-21.
Ploemen IH, Hirschberg HJ, Kraan H, Zeltner A, van Kuijk S, Lankveld DP, Royals M, Kersten GF, Amorij JP. Minipigs as an animal model for dermal vaccine delivery. Comp Med. 2014 Feb;64(1):50-4. Daarnaast wordt bij brandwonden onderzoek veel gebruik gemaakt van varkenshuid eveneens bij andere vormen van wondgenezing.
- 3.1 Voldoende titer antilichamen tegen HA is een bewezen correlatie met bescherming. Cellulaire immuniteit tegen nucleoproteïne is in proefdieren ook gecorreleerd met bescherming (Luo et al., Virol J. 2012;286. Induction of cross-protection against influenza A virus by DNA prime-intranasal protein boost strategy based on nucleoprotein, en Wang et al., PLoS One. 2012;7(12): e52488 Robust immunity and heterologous protection against influenza in mice elicited by a novel recombinant NP-M2e fusion protein expressed in E. coli.). Opzet van experiment 4 was juist om met cellulaire immuniteit tegen nucleoproteïnen bescherming te krijgen. In eerste instantie was HA toegevoegd in fase 4, we willen graag discussiëren over juist het weglaten van HA. Indien de DEC het weglaten van HA niet goedkeurt, willen we in fase 3 ook HA toevoegen.
- 3.4 Gebruik adjuvantia: zie boven de reactie waarom we juist ook cellulaire immuniteit willen stimuleren.

- 3.4 Gebruik vectoren lichten we toe ter vergadering, want dit had een relatie met het doel van experiment 4.
- 3.4 Bloed afnemen op dag van challenge: In het projectvoorstel is reeds genoemd dat ook inductie van antilichamen een uitleesparameter is, er wordt verwezen naar een artikel van Loeffen et al, waar dat ook gebeurd is, in bijlage 4 is beschreven dat serologie een van de uitleesparameters is, in het werkprotocol zal dat ook benoemd worden.
- 3.4 neuraminidase hersteld en verwijderd.
Bijlage 2: De varkens worden beperkt gevoerd, omdat we willen weten hoeveel ze opnemen. Het beperkt voeren zal tegen ad lib opname aan zitten. Daarnaast zullen we wateropname ook scoren. Uiteraard worden de dieren ook dagelijks klinisch gescoord en wordt gelet op uitingen van ongerief zoals tandenknarsen en kreunen.
- Bijlage 4: De opmerking over MHC type is gewist, omdat we met een ELISPOT werken.

- Datum: 30-09-2015
- Strekking van de vragen:
 - DEC-formulier: Graag de vragen 1c t/m 1e nog invullen.
 - Projectvoorstel: De DEC verzoekt u het doel nog verder aan te scherpen. Het "dubbele" doel moet beter worden uitgelegd. De DEC raadt u aan om het preklinisch onderzoek als hoofddoel te noemen en het onderzoek in varkens als spin-off hiervan. Dus tot en met bijlage 3 betreft het fundamenteel onderzoek voor de mens, daarna is het onderzoek translationeel voor het varken. Daarbij tevens aangeven dat vanwege de overeenkomst met de mens is gekozen voor de varkenshuid en dat het onderzoek op die manier tevens kan dienen voor de ontwikkeling van een betere vaccinatiemethode voor varkens.
 - Graag nog het gebruik van HA toevoegen aan bijlagen 3 en 4.

- Antwoord: 09-10-2015
- Strekking van het antwoord:
 - Hierbij de aangepaste documenten wat betreft doelstelling en gebruik van HA. Mochten er bij u nog vragen zijn of onvolkomenheden gesignaleerd worden, dan hoor ik dit graag.

- Datum: 16-10-2015
- Strekking van de vraag: De DEC heeft geconstateerd dat u een power van 95 % gebruikt en is van mening dat in uw nog exploratieve project een power van 80% voldoende zou moeten zijn.

- Antwoord: 16-10-2015
- Strekking van het antwoord: Uw opmerking omtrent de power heb ik niet gehonoreerd, omdat drie dieren een minimaal aantal is om uitspraken te doen. Door kansprocessen zou een afwijkende uitkomst ons enerzijds een verkeerde conclusie kunnen laten trekken of bij twee dieren ons in het ongewisse kunnen laten wat betreft de conclusie. Derhalve lijkt het me

juist om de experimenten met drie dieren per groep uit te voeren. Mocht u ondanks deze motivering aanpassing in de tekst willen voorstellen, dan hoor ik het graag.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang omdat het onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een effectieve vaccinatiemethode met een DNA vaccin door middel van tatoeëren van de huid waarbij naar verwachting naast humorale immuniteit ook cellulaire immuniteit wordt geïnduceerd. Juist de inductie van cellulaire immuniteit is in de humane geneeskunde zeer gewenst, omdat bijvoorbeeld de afweer tegen tumoren verloopt via cytotoxische T-cellen. Het gebruik van de varkenshuid is daarbij essentieel, omdat deze veel - in feite de meeste - overeenkomsten heeft met de menselijke huid en het mogelijk maakt een aantal zaken goed uit te zoeken, zoals het bepalen van de meest optimale transfectiemethode, DNA-formulering en versterking van de penetratie. Deze drie punten worden in bijlagen 1t/m 3 uitgewerkt. In het varken kan ook goed worden onderzocht of T-cel cytotoxiciteit en antilichaamvorming is gegenereerd. Het virus dat gekozen is voor de preklinische fase in het onderzoek is het HPV serotype 16. Tot zover zijn de

resultaten van belang voor mens en varken. Voor de mens zal een METC-traject moeten volgen alvorens sprake kan zijn van toepassing. Voor het varken is in dit project opgenomen (bijlage 4) een infectie proef met het varkens influenzavirus, waarbij duidelijk zal worden of de door vaccinatie geïnduceerde immuunrespons voldoende is om de infectie te voorkomen. Indien succesvol kan deze methode, of een aanpassing daarvan, toegepast gaan worden in de varkens geneeskunde waar infecties met het influenzavirus een probleem zijn.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Gefokt voor dierproeven (11)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Huisvesting en verzorging
 - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. In de bijlagen 1, 2 en 3 is het ongerief ingeschat als gering op basis van een kortdurende algehele anesthesie in combinatie met lokale anesthesie tijdens de tatoeëring. In bijlage 4 is het ongerief ingeschat als matig, omdat hier een challenge plaatsvindt met influenzavirus, hetgeen zeker in de controledieren kan leiden tot een lichte benauwdheid.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In dit project wordt een nieuwe vaccinatiemethode opgezet in varkens. Dit vereist een intact immuunapparaat en derhalve een intact en levend dier om de effectiviteit ervan goed te kunnen vaststellen. Ex vivo worden bloed en lymfekliercellen onderzocht om de cellulaire en humorale immuunrespons ten gevolge van de vaccinaties vast te stellen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken varkens is realistisch ingeschat en onderbouwd. Voor aanvang van de proef is vooronderzoek gedaan op varkenshuid van dieren die gedood zijn in het kader van andere experimenten voor wat betreft de toegepaste injectietechnieken en de techniek van tatoeëring.

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 varkens worden door de onderzoekers intensief gemonitord. De onderzoekers testen in de eerste fasen van de proeven (bijlagen 1 t/3) een aantal variabelen uit zodat in de laatste fase (bijlage 4) optimale condities bekend zijn hetgeen betekent dat minder dieren hoeven te worden gebruikt. Daarnaast is in fase 0 de techniek van tattooering aangeleerd en geoptimaliseerd op varkens huid van dieren die in het kader van ander onderzoek gedood zijn .
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

De doeleinden van het project zoals geformuleerd onder C3 rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van de varkens. De schade die de varkens oplopen is verantwoord, omdat uit wetenschappelijk oogpunt verwacht mag worden dat de op te zetten vaccinatiemethode bijdraagt aan het vinden van mogelijkheden om naast humorale immuniteit ook effectieve cellulaire immuniteit te induceren in de mens en in het varken. Dit is van groot belang omdat voor de afweer tegen tumoren, sommige virusinfecties en intracellulair groeiende bacteriën met name cellulaire immuniteit noodzakelijk is voor de klaring van de infectie respectievelijk de afweer tegen de tumor. Bij de mens is verbetering van de mogelijkheden om cellulaire immuniteit te induceren via vaccinatie zeer gewenst. De combinatie van een preklinisch deel van belang voor mens en dier acht de DEC een sterk punt. Het finale onderzoek dat moet bewijzen dat de methode effectief is in het doeldier het varken is een logisch sluitstuk van het project. Dit alles overwegende oordeelt de DEC unaniem dat het belang van het doel van het project opweegt tegen het ongerief dat de varkens zullen ondervinden. De DEC acht het gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



B.J.M. Zegers
Voorzitter DEC Utrecht



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015329

Bijlagen

2

Datum 30 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015329. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2016
Geplande einddatum: 1 januari 2018
Titel project: DNA vaccinatie met nanopartikels
Titel niet-technische samenvatting: DNA vaccinatie met nanopartikels
Naam DEC: Naam DEC
E-mailadres DEC:

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Utrecht
Datum: 25 november 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002015329

Bijlagen

2

Datum 30 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 30 november 2015

Vervaldatum: 30 december 2015

Factuurnummer: 15700329

| Omschrijving | Bedrag |
|--|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002015329 | € 741,00 |

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[Redacted]
t.a.v. [Redacted]
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

Centrale Commissie Dierproeven

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

Onze referentie
AVD108002015329

Uw referentie

Bijlagen

Datum 21 december 2015
Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte [Redacted]

Op 18 november 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "DNA vaccinatie met nanopartikels" met aanvraagnummer AVD108002015329.

Welke informatie nog nodig

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

U beschrijft in uw aanvraag de keuzemomenten tussen de verschillende dierproeven. U geeft aan dat u de meest optimale nanopartikel formulering, penetration enhancer en transdermale adjuvans zult selecteren voor de volgende fases in het onderzoek. U geeft echter niet aan op basis waarvan u zult besluiten het onderzoek niet voort te zetten. U wordt verzocht, voor elk van de fases, aan te geven of er een minimaal effect vereist is om het onderzoek in een volgende fase te kunnen voortzetten met een van de geteste stoffen. Deze vraag wordt gesteld om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

Opsturen informatie

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. De CCD zou de gevraagde informatie echter graag uiterlijk donderdag 24 december 2015 van u ontvangen om uw aanvraag in de eerstvolgende vergadering te kunnen behandelen. U kunt deze informatie onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD108002015329) aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Datum

21 december 2015

Onze referentie

AVD108002015329

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

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

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

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

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Utrecht, 23 dec 2015

Geachte CCD,

Naar aanleiding van uw vraag (dd. 21 dec. 2015, ref. AVD108002015329) omtrent de stopcondities van de verschillende fasen in het experiment doe ik u de volgende informatie toekomen.

Vraag:

U beschrijft in uw aanvraag de keuzemomenten tussen de verschillende dierproeven. U geeft aan dat u de meest optimale nanopartikel formulering, penetration enhancer en transdermale adjuvans zult selecteren voor de volgende fasen in het onderzoek. U geeft echter niet aan op basis waarvan u zult besluiten het onderzoek niet voort te zetten. U wordt verzocht, voor elk van de fasen, aan te geven of er een minimaal effect vereist is om het onderzoek in een volgende fase te kunnen voortzetten met een van de geteste stoffen. Deze vraag wordt gesteld om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

Antwoord:

In fase 0, wanneer we gebruik maken van huid van varkens, die om andere redenen gedood zijn, zal de expressie min de achtergrond significant hoger moeten zijn dan 0. De formulering met de hoogste expressie gaat vervolgens door naar fase 1.

Voor fase 1 geldt hetzelfde criterium, alleen wanneer de formulering een significant hogere expressie dan 0 geeft gaan we door naar fase 2.

Voor fase 2a geldt dat er zsGreen positieve APCs in de DLN moeten kunnen worden gedetecteerd we toch doorgaan naar fase 2. Dit is gebaseerd op ervaringen met muizen, persoonlijke mededeling van dr. A. Bins, paper is in voorbereiding. Voor fase 2b geldt dat als in geen van de condities antigeen transfer kan worden vastgesteld we niet doorgaan naar fase 3.

Voor fase 3 geldt dat er een meetbare CTL expressie moet zijn, gemeten m.b.v. de ELISPOT. Zo niet dan gaan we niet door naar fase 4.

Hopelijk is het geformuleerde stappenplan verhelderd.

Met vriendelijke groeten,



Fase1:

idem

Fase2a:

Geen stop, als geen expressie dan wordt doorgedaan met conditie 4.

Fase 2b:

als in geen van de condities antigeen transfer kan worden vastgesteld

Fase3:

Geen meetbare CTL inductie



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

t.a.v. [REDACTED]

Postbus 12007

3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

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

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD108002015329

Uw referentie

Bijlagen

Datum 21 december 2015

Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte [REDACTED]

Op 18 november 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "DNA vaccinatie met nanopartikels" met aanvraagnummer AVD108002015329.

Welke informatie nog nodig

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

U beschrijft in uw aanvraag de keuzemomenten tussen de verschillende dierproeven. U geeft aan dat u de meest optimale nanopartikel formulering, penetration enhancer en transdermale adjuvans zult selecteren voor de volgende fases in het onderzoek. U geeft echter niet aan op basis waarvan u zult besluiten het onderzoek niet voort te zetten. U wordt verzocht, voor elk van de fases, aan te geven of er een minimaal effect vereist is om het onderzoek in een volgende fase te kunnen voortzetten met een van de geteste stoffen. Deze vraag wordt gesteld om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

Opsturen informatie

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. De CCD zou de gevraagde informatie echter graag uiterlijk donderdag 24 december 2015 van u ontvangen om uw aanvraag in de eerstvolgende vergadering te kunnen behandelen. U kunt deze informatie onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD108002015329) aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Datum

21 december 2015

Onze referentie

AVD108002015329

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

t.a.v. [redacted]
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

**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
AVD108002015329

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 19 januari 2016
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [redacted]

Op 26 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'DNA vaccinatie met nanopartikels' met aanvraagnummer AVD108002015329. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 24 december 2015 heeft u digitaal gereageerd op onze vraag.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij geldt de algemene voorwaarde zoals genoemd in de vergunning.

U kunt met uw project 'DNA vaccinatie met nanopartikels' starten. De vergunning wordt afgegeven van 19 januari 2016 tot en met 01 januari 2018.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies gevoegd van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht van 17 november 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie.

Bezwaar

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

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

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

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

Datum

19 januari 2016

Onze referentieAanvraagnummer
AVD108002015329

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter

Algemeen Secretaris

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

Bijlagen**- Vergunning**

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Universiteit Utrecht
Postbus: Postbus 12007
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 januari 2016 tot en met 01 januari 2018, voor het project 'DNA vaccinatie met nanopartikels' met aanvraagnummer AVD108002015329, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. In aanvulling op het DEC advies is een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair hoofddocent.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 26 november 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 november 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 november 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 november 2015;
 - d. Aanvullende informatie van de aanvrager, zoals ontvangen per digitale indiening 24 december 2015

Dierproeven

| Naam dierproef | Diersoort | Aantal dieren | Ernst |
|--|-----------|---------------|-------|
| optimalisatie van transfectie efficiëntie door middel van polyplexen | Varkens | 16 | Licht |
| testen van de antigen transfer van de huid naar de lymfknoop | Varkens | 12 | Licht |
| locale adjuvantia voor optimale CTL inductie | Varkens | 18 | Licht |
| Antilichaam en CTL inductie tegen varkens griep virus | Varkens | 24 | Matig |

Voorwaarden

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

Algemene voorwaarde

1.) In artikel 10, lid 1a van de wet, 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 de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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

Datum

19 januari 2016

Onze referentieAanvraagnummer
AVD108002015329

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.