

Inventaris Wob-verzoek W17-12										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20171964	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x						
5	DEC-advies				x		x	x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
7	Aanvullende informatie				x		x	x		
8	Adviesnota CCD		x						x	
9	Beschikking en vergunning				x		x	x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

27 JUNI 2017

- 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.centralecommissiedierproeven.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 50400 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Triskelion BV
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	51382997
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	
		Postbus	844
		Postcode en plaats	3704 HE Zeist
		IBAN	NL101NGB0654470189
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Triskelion B.V.
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]
		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 01 - 01 - 2018
- Einddatum 01 - 01 - 2023
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek voor de ontwikkeling van producten ter behandeling van en bescherming tegen griep.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-TNO
- Postadres 96800 2509 JE DEN HAAG
- E-mailadres _____

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning €1035,00 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
 s.v.p. uw factuur o.v.v. 'vooruitbetaling' en het bestelnummer 56001154 indienen via e-mail bij [REDACTED], adres:
 Triskelion BV T.a.v Crediteurenadministratie
 Postbus 844, 3700 AV, Zeist
 + Triskelion bestelnummer 56001154

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 [REDACTED]
 Functie [REDACTED]
 Plaats Den Haag
 Datum 26 - 06 - 2017
 Handtekening [REDACTED]



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Context

Influenza virus is the causative agent of the flu. Each year, influenza virus infects 5-10% of the population causing approximately 3-5 million cases of severe illness and 250,000-300,000 influenza-

related deaths worldwide. In addition to the societal impact, influenza virus infections also have an enormous economic impact: Costs in the United States of America alone are estimated to be 71-167 billion dollar each year (World Health Organization (WHO) Factsheet 2014/2011 Influenza).

These seasonal influenza virus infections have the greatest impact on risk groups, such as elderly and immunocompromised individuals, since their immune response is ineffective in protecting against disease. In contrast, pandemic influenza virus outbreaks affect individuals of all age groups. In the past centuries, at least four pandemics have occurred. The most severe pandemic in history occurred during 1918-1919, when approximately one third of the world's population was infected and an estimated 50 million people died (Taubenberger et al, Emerging infectious diseases 2006). More recently, the 2009 H1N1 pandemic resulted in approximately 250,000 deaths, which mostly affected individuals under 65 years of age (Simonsen et al, PlosMedicine 2013).

Influenza virus composition

Influenza virus can be categorized into three virus subtypes: Influenza A, B and C. Type A can infect both humans and animals such as birds and pigs, and is the primary cause of the influenza epidemics and pandemics. Influenza B virus can only infect humans and is the other cause of seasonal influenza epidemics. Influenza C virus infection mostly occurs in children and causes an infection comparable to the common cold.

Subtyping of influenza A virus occurs based on its surface proteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). At the moment, 18 different HA subtypes and 11 different NA subtypes have been described. The combination of the specific HA and NA subtype is used for naming the virus, e.g. H1N1, H3N2, H5N1. The HA and NA proteins continually change due to mistakes (mutations) during replications that are not repaired, this process is called antigenic drift.

Due to the way a virus particle is assembled, viruses of two different subtypes can combine, thereby forming a new subtype. This may occur when one cell is infected with two different virus subtypes, during a process called antigenic shift. These new virus subtypes pose a great threat to society, since there is no immunity present. Another threat is that subtypes circulating in birds, such as H5N1 and H7N9 can infect humans. If these viruses mutate in such a way that they are transmittable between humans, there is a strong possibility that they cause a pandemic.

Immune response to influenza

During a natural influenza infection, both a humoral and a cellular immune response will be induced: The humoral response consists of antibodies, mostly directed to HA, that can neutralize the virus by capturing the virus particle before it infects a cell. The humoral immune response will protect an individual against a new infection for several years, but only if this infection is caused by a virus with a similar HA-subtype. The cellular immune response is mostly directed to the internal proteins (M1, NP) of the virus. Once a cellular response is induced, the immune cells can detect virus-infected cells and can subsequently kill these cells, thereby preventing further spread of the virus.

Treatment methods

Currently, there are two types of therapeutic treatments available that are capable of relieving symptoms of the flu. The most commonly used treatment method inhibits the function of the NA protein, thereby preventing spread of the virus. The other treatment method is based on blocking viral entry. However, influenza viruses have been circulating that are resistant to these treatments, this lack of efficient treatment of patients that are infected with resistant influenza virus can likely result in death. Therefore development of new antiviral drugs against influenza virus is required.

Another strategy is to protect risk groups by vaccination, which is a preventive treatment method. The majority of seasonal vaccines that are currently used induce a humoral immune response against HA and NA proteins. These vaccines are developed based on annual predictions by the WHO which virus subtypes will most likely circulate in the next influenza season. Due to the continually changing HA and NA proteins, these vaccines will not (fully) protect against newly emerging influenza subtypes. In addition, the vaccine needs to be administered annually to ensure protection to the seasonal influenza strains circulating in the subsequent season. Consequently, when a vaccine is not protective against the circulating influenza virus, the only treatment option after infection are antiviral drugs.

Therefore, due to the variable nature of the influenza virus and the emergence of new influenza strains, the development of new strategies to alleviate disease or to prevent infection is required.

Current status

In recent years, a lot of progress has been made in the development of both new treatment methods and vaccines capable of providing broader protection.

For example, combination treatment of a standard antiviral drug with a new treatment method has been described (Dunning et al, *The Lancet Infectious Diseases* 2014; Seo et al, *Antiviral Therapy* 2013). Also potential new viral targets have been described, thereby ensuring that there is a treatment available for individuals infected with resistant strains (as reviewed by Loregian et al, *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014).

Universal vaccines:

There also has been great progress in the development of vaccines capable of providing protection against multiple influenza subtypes, both by inducing antibody and T cell responses to conserved parts of the influenza virus.

The primary targets for antibody-driven vaccines are the conserved regions of HA and Matrix 2 protein (M2e). Hereto, several strategies can be applied. In recent years, broadly protecting monoclonal antibodies have been described directed to conserved epitopes of the HA protein (Throsby et al, *PlosOne* 2008; Ekiert et al, *Science* 2009; Dreyfus et al, *Science* 2012; Impagliazzo et al, *Science* 2015). Other options are the use of small proteins, including single or multi domains and peptide-vaccination strategies (Steel et al, *MBio American Society for Microbiology* 2010; Wang et al, *PNAS* 2010). Examples of targets for T cell-inducing vaccination strategies are the internal proteins of influenza virus, such as nucleoprotein (NP) and matrix protein (M). In this regard different strategies, such as immunization with peptides, the use of vectors and RNA-based vaccination strategies are applied (Francis et al, *Vaccine* 2015; Vitelli et al, *PlosOne* 2013; Magini et al, *PlosOne* 2016; Soema et al, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015).

However, development of vaccination strategies and the development of new types of antiviral drugs are still ongoing and to this end, potential products need to be examined for their immunogenicity and efficacy against a range of influenza virus subtypes.

Although primary screening of these vaccination strategies is often performed *in vitro*, all promising products will continue to be tested in *in vivo* studies as no *in vitro* alternatives are available as it is not possible to directly study the interaction between the immune response, virus and antiviral compound in *in vitro* models. The *in vivo* phase is mostly focussed on route of administration, adjuvants or carriers to be used, optimal dose, administration schedule, possible side effects and efficacy of the product.

This project proposal will aid in the development of new products for the prevention and treatment of influenza virus infection, by allowing examination of these variables. The results of this research will eventually be used for applying the product for approval to the regulatory authorities.

3.2 Purpose

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

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

The main objective of this project proposal is aiding in the development of vaccination strategies and antiviral drugs.

Hereto, animal studies are required to evaluate vaccines or antiviral drugs before they can proceed in the developmental pipeline. We have extensive experience with influenza virus challenge models in mice with a wide range of influenza subtypes, including different subtypes of Influenza A (H1N1, H3N2, H5N1, H7N7, H7N9) and Influenza B models. Animal handling, including clinical observation of the animals in order to score severity of the influenza infection, is performed by fully trained biotechnicians. This results in robust and reproducible models, in which a wide range of vaccines and antiviral drugs can be studied. Our experience makes it possible to determine not only the immunogenicity of vaccines or the mechanism of action of antiviral drugs, but also their efficacy in protecting against a wide range of influenza virus subtypes. In this regard, it may be necessary to develop new influenza virus mouse

challenge models if there is a need to study efficacy of a product against a specific influenza strain. Here, you can think of models against possible new pandemic strains (bird flu), but also models for seasonal influenza strains if considered more relevant than the strains currently available.

3.3 Relevance

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

There are many types of vaccines and antiviral drugs directed against influenza virus infection under development. This project proposal will contribute to the development of new therapeutic options for patients by providing influenza challenge models in which these products can be evaluated. The results of these studies will contribute to the knowledge against which strains these products are effective in vivo. In addition, more information will be provided on the desired route of administration, dosing, treatment schedule, in preparation of the final product to be administered to the patient.

In turn, the information generated by these in vivo studies will contribute to the development of universal influenza vaccines for example, which are designed not only to protect against seasonal influenza virus strains, but also potential pandemic threats. These vaccines will reduce the societal and economic impact of influenza virus by reducing the worldwide number of influenza infections.

Studies in which antiviral therapies are investigated will contribute to effective treatment of hospitalized patients undergoing a severe influenza infection. Recently, influenza strains have been identified which are resistant to standard treatment. New antiviral strategies or combination therapies make it possible to treat individuals more effectively, thereby reducing the number of influenza-related deaths.

3.4 Research strategy

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

Before each study is initiated, the need for an animal study will be evaluated in a project team which may consist of (senior) scientists, biostatisticians and/or pharmacologists. The project team will evaluate the interim results and make recommendations on the number of animals per treatment group, doses used, etc., to maintain the scientific quality of the project. As a contract research organization, most of this work will be performed by the customer. However, in all cases, upon receipt of a study request, a study director (SD, project leader) is appointed, who will form a project team and the project proposal will be discussed scientifically and ethically with the customer. The animal welfare body and the designated veterinarian will be consulted on issues of animal welfare. For most studies a 'pre-study briefing' is performed by the study director to ensure understanding of the study objectives and design by the staff involved. During the study, any adverse effects or other concerns concerning animal welfare will be monitored by the study director and discussed with relevant staff.

When new vaccines or antiviral therapies need to be studied in vivo, a specific influenza challenge model will be selected. We distinguish three types of models: Seasonal influenza A (including H1N1 and H3N2-strains, which are categorized as BSL-2), seasonal influenza B (which are also categorized as BSL-2 strains) and (possible) pandemic strains such as H5N1 and H7N9 (which are categorized as BSL-3).

When a study is planned, the customer together with relevant staff, will use a list of questions to determine which model(s) should be used and how this model should be designed.

- a. Was the immunogenicity and efficacy of the vaccine or antiviral determined in another study in vitro or in vivo? If yes, how are these results translated into the study design? If no, see points b-f.
- b. What is the reason for using an influenza virus challenge model in mice?
- c. Is the target of the vaccine or antiviral specific for a certain influenza subtype? If yes, a model that suits the needs should be used. If no, the objective of the study may determine the correct model, e.g. if the objective is to determine whether the vaccine can be used for bird flu, a model with bird flu should be used.
- d. Can the objective(s) of the study be answered with the study design?
- e. What is the preferred route of administration?*
- f. How is the dose determined?*
- g. How is the treatment schedule determined?*

* This could also be an objective of the study, in that case the results may be used for follow-up studies.

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

The project consists of different components:

Set-up and validation of new influenza virus models, vaccine immunogenicity and efficacy studies, and prophylactic or therapeutic studies with antivirals.

The general outline of the animal procedures is as follows:

If a new substance needs to be tested, animals will be immunized or will receive prophylactic or therapeutic treatment with an antiviral compound. On 'day 0' of the challenge phase of the study is initiated by intranasal (i.n.) administration with the corresponding influenza virus and bodyweight and clinical signs will be monitored for 14 to 21 days as a measure of severity of disease. During the study, blood samples may be drawn for further analysis. If necessary for other immunological analyses (virology, histology), animals may be sacrificed at an earlier time point to harvest organs.

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

If the new drug requires assessment of the protective efficacy against a new type of influenza virus, first set-up and validation of the new influenza virus model will be performed. If the required influenza virus model is already available, one of the following may be performed:

Vaccine immunogenicity and efficacy studies:

Animals will be immunized and blood samples will be drawn or organs may be harvested to determine immunogenicity of the vaccine. If possible to combine with analysis of immunogenicity, immunization can be followed with influenza virus challenge to determine efficacy. Depending on both immunogenicity and efficacy of the tested compound, follow-up experiments will be performed.

Prophylactic or therapeutic studies with antivirals:

Animals will be treated with antivirals before challenge with influenza virus prophylactic or animals will be challenged with influenza virus and subsequently treated with antivirals (therapeutic).

These steps depend on the developmental phase of the substance to be tested in the developmental pipeline: Of products that are early in the developmental pipeline, the complete process may be followed of first immunogenicity studies and then challenge studies. Products that are further in the developmental pipeline may be tested directly in challenge studies.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Influenza virus challenge model
2	

3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Triskelion B.V.	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Influenza virus challenge model

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The project consists of different components:

Set-up and validation of new influenza virus models, vaccine immunogenicity and efficacy studies, prophylactic or therapeutic studies with antivirals.

The outline of the animal procedures is comparable for these components: In case of development and validation of new influenza virus models, animals will only be challenged with influenza virus, after which body weight and clinical signs will be monitored and animals will be sacrificed at a set time point (see 'challenge phase').

In case of vaccine immunogenicity and efficacy studies or prophylactic/therapeutic studies with antivirals, animals will additionally receive some form of treatment, either before (prophylactic), on the same day, or after virus challenge (therapeutic).

The general design of the animal procedures is as follows:

Treatment phase

Vaccine immunogenicity and efficacy studies:

Animals will receive immunizations on one or more time points before virus challenge. The choice of these time points is made based, for example, on previous experience with the vaccine or a similar type of vaccine or literature on that subject. Generally, two time points will be chosen, two or three weeks apart. Then, approximately two or three weeks after the last immunization, animals will be challenged with influenza virus.

Prophylactic or therapeutic studies with antivirals:

Animals will be immunized or will receive prophylactic or therapeutic treatment with an antiviral compound, which is generally administered at time points closer to the day of challenge, i.e. a few days before or after virus challenge.

For both types of studies: During the pre-infection phase, blood samples may be collected to determine response to the treatment that is administered or (sub)groups of animals may be sacrificed at an earlier time point for immunological analysis of organs, for example.

Challenge phase

All components will have a challenge phase included:

On 'day 0', which is the start of the challenge phase of the study, animals are administered intranasally with the corresponding influenza virus. In addition, clinical signs are monitored each morning (a.m.) and afternoon (p.m.) from the day of challenge onwards until sacrifice. Together with body weight, clinical signs are an important parameter to measure severity of disease. In the morning (a.m. time point) on the day of challenge and the following days until sacrifice, body weight of each animal will be recorded at the a.m. time point. Besides survival, body weight is the primary parameter of influenza virus challenge studies in mice, since the measure of body weight decrease is correlated with the severity of influenza infection, i.e. the larger the body weight decrease, the more severe the infection is. In addition, clinical signs are monitored each morning (a.m.) and afternoon (p.m.) from the day of challenge onwards until sacrifice. Together with body weight, clinical signs are an important parameter to measure severity of disease.

The challenge phase generally lasts 14 or 21 days, after which surviving animals are sacrificed. If necessary for further analysis (virology, histology, immunology), animals may be sacrificed at an earlier time point to isolate organs for further analysis.

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

The animal studies are performed in our American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) certified animal facility. All study procedures will be performed by qualified animal care specialists, which have extensive training in all animal procedures performed in these studies. Procedures are performed according to standard operating procedures (SOPs).

The basis of all type of experiments will be a mouse challenge model, in which survival is the primary read-out, together with body weight and clinical signs as read-out parameters (see 'Challenge phase' for a summary of the procedures).

Set-up and validation studies:

If considered necessary for obtaining the goal of the experiment, new influenza challenge models may be set up. In these set-up and validation studies, the selected influenza virus strain will be assessed for virulence by calculating the 50% Mouse Lethal Dose (MLD₅₀). The MLD₅₀ value calculated from these set-up studies will be used to calculate the required influenza virus challenge dose in all future studies in which that particular influenza virus strain is used. Set-up and validation studies may consist of three steps. If the virulence of the influenza virus strain in mice is known and/or can be obtained from literature, step 1 and 2 are not necessary and we will directly proceed with step 3.

Step 1 (mouse adaptation):

It may be necessary to perform adaptation of the influenza virus strain to mice to ensure that the virus will infect the animal and will induce disease. An example of a virus, which is highly relevant for research, but needs adaptation before it can be used in mice is the H1N1 virus that caused the pandemic in 2009. Mouse adaptation will occur by administration of the 'human' influenza virus to the animal and collection of the virus from the lungs after a few days. The virus will then be isolated from the mouse lung and administered to a naïve mouse. By repeating this process, the influenza virus will adapt so it will survive and replicate in mice. If the animals are susceptible to the adapted influenza virus, the animal will display clinical signs and body weight loss. When this occurs, the virus is considered mouse-

adapted and we can proceed with step 2 (range finding).

Step 2 (range finding):

In step 2, a range finding experiment will be performed in which two groups of four mice will be infected with different dilutions of the virus (the factor between these dilutions may differ between influenza virus strains and is based on literature and/or information provided by the customer).

Step 3 (calculation MLD₅₀):

Based on the results of step 2, or directly if information on the virulence of the influenza virus strain is known, step 3 will be performed to be able to calculate the MLD₅₀ using the Spearman-Kärber method. Therefore, six groups with eight mice per group will be infected with a range of serial dilutions of the virus. Outcome of the study is optimal when the highest dose(s) result in 100% mortality and the lowest dose(s) result in 100% survival.

For vaccine immunogenicity and efficacy studies, and prophylactic or therapeutic studies with antivirals:

Route and frequency of the treatment:

For compounds that are further into development, the route of treatment is generally based on the anticipated human administration route. In addition, the route and frequency of treatment is dependent on physical/chemical properties of the test substance and its bioavailability. For example, for vaccine studies, the frequency of treatment is often based on the anticipated immune response that is required for protection, while for studies with antivirals, the bioavailability of the compound is an important factor. Possible routes of administration are oral, intranasal, intramuscular, intratracheal, intravenous and subcutaneous. A rationale for the chosen route and frequency will be provided for each experiment and communicated to the Animal Welfare Body (AWB). All procedures will meet the criteria described by Diehl et al in 'A good practice guide'.

Blood sampling:

If required, blood samples will be collected from selected groups at certain time points (detailed information will be available in the design). All blood sampling procedures will meet the criteria described by Diehl et al in 'A good practice guide'. Blood samples may be drawn via the tail, retroorbital or mandibular.

If a blood sample is also required at sacrifice (day 14 or day 21 post-challenge), total blood will be collected from all surviving animals during exsanguination from the orbita or via cardiac puncture (under O₂/CO₂ anesthesia).

Collection of organs:

To obtain further information on the mechanism of action of the vaccine or antiviral compound, it may be considered necessary to perform analysis, pre- or post-infection, in different organs including, blood, lungs, spleen, bone marrow and lymph nodes. Examples are measuring the number of infectious particles in a certain organ (e.g. lung viral load), histopathology and the analysis of virus- or compound- specific immune cells. To perform these type of analysis it may be necessary to sacrifice the animals on different time points, before or after influenza virus infection, to collect the organs of interest. When applicable, the rationale will be communicated to the Animal Welfare Body (AWB).

Example study design immunogenicity and efficacy study:

Group	Animals/group	Treatment	Blood sampling	Virus infection	Day of sacrifice*
1-X	8	Days -49, -28	Day -50, -29, -1	Day 0	Day 21
Control group	11	Days -49, -28	Day -50, -29, -1	Day 0	Day 21

Example study design therapeutic antiviral study, which includes a group (Y-Z) for lung viral load:

Group	Animals/group	Virus infection	Treatment	Day of sacrifice*
1-X	10	Day 0	Days 1-6	Day 21

Y-Z	5	Day 0	Days 1-4	Day 5
-----	---	-------	----------	-------

*Of surviving animals

For all studies:

Influenza virus challenge:

In all experiments performed under this protocol, animals will receive a viral challenge with a lethal dose of X MLD₅₀ of the selected influenza strain. Influenza virus will be administered intranasally to anesthetized animals to establish infection not only in the nose, but also in the trachea and lungs. Animals will be anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine and xylazine. Ketamine/xylazine was chosen over isoflurane, since isoflurane has the same route of administration as the virus and the effect of isoflurane anesthesia on influenza virus infection is unknown. Following anesthesia, the animals will receive 50 µL of influenza virus divided in an equal volume per nostril by means of an air displacement pipette. The unconscious animal will be held on its back with its head tilted (nose pointed up) and the animal will be held in this orientation until the complete dose has been breathed down. A new, clean pipette tip will be used for dosing of each animal.

Observation and measurements:

The observation of clinical signs and body weight will be performed as described below:

Pre-challenge:

Clinical observation of the individual animals, to detect reaction to treatment as well as signs of ill-health, moribund or dead animals, will be conducted at least once daily from the day of allocation onwards up to the day of infection.

Post-challenge:

Clinical observation of the individual animals, to detect reaction to treatment as well as signs of ill health, moribund or death, will be conducted twice daily during the daytime within fixed time periods with an intervening time period of at least 5 hours for each animal from day 0 onwards until death or scheduled sacrifice.

An animal will be considered moribund if lethargy is noted in four subsequent observations. If alive at the following observation without a decrease in clinical signs caused by the influenza infection (resulting in a clinical score of 3 or lower, i.e. no sign of recovery), the animal will be killed for ethical reasons.

The following scoring system will be used to grade the severity of influenza infection:

- 0 = no clinical signs;
- 1 = piloerection;
- 2 = piloerection, laboured respiration;
- 3 = piloerection, laboured respiration, hunched posture;
- 4 = piloerection, laboured respiration, hunched posture, lethargic and/or thin;
- 5 = death.

All observations, including the behavioural aspects and any individual abnormality will be recorded and if necessary acted upon by contacting the animal welfare officer/veterinarian.

Body weights:

Pre-infection

Individual body weight measures will be performed in all animals shortly before start of the study (for the purpose of group allocation) and weekly from the start of the study onward or on day -x (prior to dosing) and on day 0 (prior to infection).

Post-infection

Individual body weight measures will be performed once daily in the morning at the same time as the observations for clinical signs from day 0 onwards until death or scheduled sacrifice (day 14 or 21). The weight of the animals that are found dead in the morning will be determined.

Endpoint:

Survival is one of the primary read-outs of these influenza challenge models, as the ability of vaccines or antivirals to prevent death due to influenza infection is an important measure of their efficacy. Both in the early and later stages of the development of vaccines and antivirals, death as an endpoint provides crucial scientific information: If the product can prevent disease, if the product may prevent death, but not disease or if the compound does not have any efficacy at all. Especially to determine whether the latter is true or false, and consequently if the product should proceed further into development or not, death as an end point provides the information necessary to make a sound decision.

Sacrifice:

The surviving animals will be sacrificed on day 14 or 21 by cervical dislocation, via O₂/CO₂ anaesthesia followed by CO₂ asphyxiation or via exsanguination under O₂/CO₂ anaesthesia. The remaining carcasses will be discarded without further investigations (unless indicated differently in the provided information about the study design).

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

The total number of animals per experiment may vary and is dependent on the number of groups and of the group size. The number of groups per experiment depends on the objective of that experiment. The group size will be calculated for each experiment using a power analysis. Historical data can be used to perform the sample size calculation and to determine the number of groups necessary.

Group size for set-up and validation studies as described above, step 2 and 3 are set, based on sample size calculation needed to determine the right range (hereby taking individual variation of the animals into account) or to calculate the MLD₅₀.

B. The animals

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

Mice are used in our models for influenza virus infection. Mice were chosen since they are a suitable model for influenza virus and there is a wide range of reagents available for analysis of a wide array of analyses. The wide range of reagents available for mice enables analysis of not only the efficacy of the vaccines or antiviral compounds, but also of the mechanism of action of these compounds. In addition, mice show consistent disease manifestations due to similarity in their genetic background.

The influenza virus challenge models we have available are set up in young adult female BALB/c mice and one strain was set up with young adult female 129S2/Sv mice.

In the type of studies that we perform (mostly preclinical studies), female mice are preferred since they have greater humoral and cell-mediated immune responses to vaccination, or other antigenic stimulation, and are more sensitive to influenza virus infection (Klein et al, *Journal of leukocyte biology* 2012; Lorenzo et al, *Vaccine* 2011). If we would test a vaccine for example, a smaller number of animals is needed if female mice are used, since females both respond better to vaccination (higher antibody titers) and are more sensitive to infection. Since survival is used as a read-out in these challenge models, less sensitivity to influenza infection (e.g. by male mice) would lead to a greater number of animals needed to draw conclusions on the efficacy of the vaccine or antiviral compound. The same holds true for the use of a different mouse strain, since each strain exhibits different weight loss kinetics and survival rates after infection with the same influenza virus strain (Srivastava et al, *PlosOne* 2009).

Therefore, if an influenza virus challenge model is set-up with a particular mouse strain and sex, the same strain and sex should always be used for analysis with that particular influenza virus strain to maintain a robust model for analysis of the effect of the vaccine or antiviral compound.

Group size of vaccine immunogenicity and efficacy studies, prophylactic studies with antivirals and therapeutic studies with antivirals varies and depends mostly on (expected) efficacy of treatment and consequently the variation within and between groups:

Generally, a group size of 10 animals per group is used in studies which survival, body weight and clinical observations are the primary read-outs. However, a power analysis is performed for each study: If a larger variation is expected, a larger group size for the control or treatment groups may be necessary to

be able to answer the research question. If a very small variation is expected, a smaller group size may be sufficient.

For immunogenicity groups, often, a group size of approximately 5 animals is used. In these groups of the study, ex vivo read-outs are used to calculate the exact group size. For example, if antibody titers are the primary read-out, group size is determined based on the variation of the antibody titer within and between groups.

To determine lung viral load titers, often a group size of 5-6 animals is sufficient to be able to calculate a significant difference between treatment groups and the control groups. However, also in this case, the exact group size needed depends on the expected difference between treatment and control groups and on the variation within a group.

In all cases a power analysis will be performed for each study, which will be communicated to and discussed with the AWB.

Based on 15 studies per year with 120 animals per study (approximately 12 groups), we expect a total number of $1800 \times 5 = 9000$ mice is needed over a period of five years.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Before each study is initiated, historical data will be considered and the question will be asked whether an animal study is necessary or if additional in vitro assays need to be performed.

Reduction: Before each study is initiated, detailed information will be gathered to determine the suitable influenza virus challenge model. For each experiment, a power analysis will be performed to calculate the number of animals needed per group and a scientific backing for the number of groups will be requested from the customer. This includes questioning whether the required control groups are included or if control groups can be excluded based on historical data, for example.

Refinement: Clinical signs, not only in the post-infection phase, but also in the pre-infection phase will be carefully monitored to be able to act when necessary. During the post-infection phase, the animals will be scored individual, twice daily. Animal caretakers, especially trained for scoring signs during influenza infection, will register these recorded clinical signs as listed under K. If the signs are observed, immediate actions will be taken to decrease the suffering, pain or discomfort. If needed the humane endpoints will be used.

After infection, the animals will receive a cup of hydrogel and feed pellets at the bottom of the cage to facilitate the access to feed and drinking water during the course of infection. Animals will be group-housed in macrolon cages provided with wood shavings (Lignocel) as bedding material and a piece of gnaw wood (Aspen) and shreds of paper (Enviro-dri) or a SMART home as environmental enrichment.

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

Animal suffering

Animal suffering is diminished by carefully monitoring the animals and by taking the humane endpoint during influenza virus infection into account. For all animal procedures, the guidelines of "Code of Practice" of Diehl are followed.

Environment

For research with Genetically Modified Organism (GMO) (for example viral vectors), our facility meets the requirements up to ML-II, DM-II and DM-III.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Anesthesia will only be performed if considered necessary for the animal procedures, but not to prevent pain or stress, since this is in contradiction with the main read-out of the influenza virus challenge models, in which survival, body weight loss and clinical observations are the primary read-outs. Consequently, using above mentioned methods are irreconcilable with the study design.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

No other adverse effects on the animals' welfare may be expected other than those arising from the procedures described in the protocol.

Explain why these effects may emerge.

Not applicable

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

If unexpected adverse effects of the test substance, for example, arise the study director (article 9) will be informed immediately. Where possible, actions will be taken to minimise severity or prevent occurrence during follow-up experiments. For example by changing the dose of administration or by taking other actions to relieve adverse effects.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Since survival is the primary read-out for these influenza virus challenge models, the use of humane endpoints will be monitored very carefully. The following humane endpoints will be used:
If an animal has shown lethargy in four previous occasions (clinical observations are performed on the a.m. and p.m. time point), the animal will be sacrificed. In addition, if animals show unexpected severe levels of discomfort, which are not related to influenza infection, the animals will be sacrificed to minimize discomfort for that animal.

Indicate the likely incidence.

In the majority of cases, animals will experience a relatively short period of disease, after which animals will or will not survive infection. If lethargy occurs is largely dependent on the efficacy of treatment, since it mostly occurs when animals have received a suboptimal vaccine or antiviral. This is estimated to occur in maybe one out of three experiments, in which a few animals show lethargy.
The occurrence of unexpected severe discomfort are incidental at most.

K. Classification of severity of procedures

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

Depending on the animal procedures (e.g. frequency, route and duration of treatment or other animal procedures), the allowed cumulative discomfort will be 'mild' or 'moderate'.

The scoring system described below is used to indicate the levels of discomfort of influenza infection:

0 = no clinical signs;

1 = piloerection;

2 = piloerection, laboured respiration;

3 = piloerection, laboured respiration, hunched posture;

4 = piloerection, laboured respiration, hunched posture, lethargic and/or thin;

5 = death

Scores '0' and '1' are categorized as 'mild'; scores '2' and '3' as 'moderate' and score '4' as 'severe' influenza infection.

Based on historical data, we expect that approximately one quarter of the animals will have a 'severe' infection, more than half of the animals will have a 'moderate' infection and the rest of the animals will have a 'mild' infection. Of the animals experiencing moderate or severe infection we expect that approximately half of the animals will not recover, i.e. will not survive influenza infection. Animals experiencing 'mild' infection will generally all recover from infection.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Since the animals went through an influenza virus infection, they may not be used after the experiment. In addition animals may be killed for the collection of tissues/blood or for ethical reasons, i.e. reaching humane endpoint.

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

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

Yes

Vragen bij projectvoorstel "Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection"

1. De belangrijkste discussie die wij als DEC hebben over deze projectaanvraag is het eindpunt van de studies: de dood. In het verleden hebben we hier uitgebreid met u over gediscussieerd, en toen heeft u ons duidelijk gemaakt dat er geen andere echt goede voorspellende parameters en daarmee geen scherpere humane eindpunten voor dit type studies. Destijds hebben we daar ook een onafhankelijke expert voor geraadpleegd. Nu hebben wij hierover opnieuw 2 vragen.
 - a. Wat zijn de ontwikkelingen in dit soort studies van de afgelopen jaren? Wordt er door u of door collega's in uw vakgebied toegewerkt naar alternatieve parameters?

Er wordt relatief weinig gepubliceerd over goede voorspellende parameters voor influenza infectie in muizen en de consensus over de humane eindpunten is dan op dit moment ook niet anders dan bij de vorige projectaanvraag. Wel hebben wij intensief contact met andere groepen die vergelijkbare experimenten uitvoeren, waarin wij onder andere ethische overwegingen, inclusief de humane eindpunten bespreken. Ook hebben wij onlangs, samen met het uitvoerend personeel, een bijeenkomst gehad waarin er nogmaals gekeken is naar de methode van scoren van influenza infectie in muizen en, daarmee samenhangend, het bepalen van humane eindpunten in deze experimenten. Deze bijeenkomst wordt regelmatig gehouden om ervoor te zorgen dat iedereen goed op de hoogte is en om iedereen scherp te houden op de gemaakte afspraken. Daarnaast zijn we als Triskelion bezig met het oprichten van een werkgroep waarin specifiek gekeken wordt naar de huidige humane eindpunten en naar methoden om deze uiteindelijk op een objectieve manier aan te kunnen scherpen. Uiteindelijk zouden we hierbij een biostatisticus willen aanhaken die daaraan kan bijdragen door een gedegen onderbouwing aan te leveren op basis van historische data.

- b. Kunt u specifiek uitweiden over de noodzaak van de dood als eindpunt voor studies in een meer verkennende fase van de ontwikkeling versus het gebruik van vroegere parameters.

Voor alle fasen van de ontwikkeling van een vaccin of antiviraal middel geldt dat de informatie die gehaald kan worden uit dood als eindpunt cruciaal is voor de ontwikkeling van het vaccin of antiviraal middel: Het blijft wetenschappelijk gezien belangrijk om te weten of een middel echt niet werkt (d.w.z. de dieren ondanks behandeling overlijden aan influenza infectie) of dat het middel wel dood kan voorkomen maar niet ziekte. In het geval van de ontwikkeling van bijv. een vaccin tegen de vogelgriep is dit wat meer vanzelfsprekend, aangezien ook een vaccin die dood door vogelgriep kan voorkomen relevant is. Maar hetzelfde geldt voor de ontwikkeling van een antiviraal middel of vaccin tegen seizoensale influenza virussen: In het geval dat dit middel nog enigszins beschermt kan het de moeite waard zijn om het middel verder door te ontwikkelen zodat het uiteindelijk wel beschermt, bijvoorbeeld door andere adjuvans, dosis of frequentie van toediening te testen. Werkt het middel echter helemaal niet, dan zal de keuze eerder gemaakt kunnen worden om te stoppen met de ontwikkeling van het vaccin of antiviraal middel. Door de dood als eindpunt aan te houden zal er dus beter een keuze gemaakt kunnen worden om wel of niet door te gaan met de ontwikkeling van het product.

Deze keuze heb ik nader toegelicht in de Appendix onder 'Describe the proposed animal procedures...', kopje end point.

2. In 3.2 geeft u aan wat het doel is van het onderzoeksproject. Hier missen we een korte toelichting bij de haalbaarheid van het doel: waarom is het juist uw onderzoeksgroep die dit onderzoek zou moeten doen? Kunt u informatie geven over de kwaliteiten en successen van de onderzoeksgroep en uw werk van de afgelopen jaren? Is de gekozen strategie (op basis van het verleden) er een die ook daadwerkelijk datgene oplevert wat u beoogt?

De afgelopen jaren heeft Triskelion veel ervaring opgebouwd in het uitvoeren van influenza virus challenge proeven met verschillende influenza virussen en voor verschillende behandelingen. Deze ervaring heeft geresulteerd in robuuste modellen, d.w.z. dat we een goede voorspelling kunnen maken hoe een model verloopt en daardoor gedegen advies kunnen geven over het meest geschikte model benodigd voor het beantwoorden van het doel van het experiment.

Deze ervaring heeft tot nu toe bijgedragen aan het opbouwen van langlopende samenwerkingen waarbij we gedurende het ontwikkelingstraject van o.a. vaccins in verschillende fasen van het traject experimenten hebben uitgevoerd. Een aantal van deze samenwerkingen staan beschreven in onderstaande publicaties, waarin Triskelion ook genoemd wordt:

- Cox 2015 Virology Journal Matrix-M adjuvation broadens protection induced by seasonal trivalent virosomal influenza vaccine
- Roozendaal 2015 Vaccines & Vaccination H5N1 protection by seasonal influenza vaccine in homologous and heterologous prime/boost vaccination
- Impagliazzo 2015, Science, A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen.

Daarnaast worden momenteel twee manuscripten geschreven die voortkomen uit een langdurige samenwerking op het gebied van de ontwikkeling van o.a. een antiviraal middel. Deze publicaties dragen uiteraard bij aan het delen van kennis en zullen daarnaast bijdragen aan de (verdere) ontwikkeling van producten ter voorkoming en bescherming van griep. Deze informatie heb ik toegevoegd aan de general description, in 3.2.

3. In de bijlage onder B, The animals, is sprake van "young adult females". Kunt u hierbij iets meer vertellen over de transleerbaarheid naar menselijke mannen en ouderen?

Tijdens de fase van het onderzoek waarin wij de experimenten uitvoeren, is de belangrijkste vraag gericht op het werkingsmechanisme van het vaccin of het antivirale middel. Hierbij is het met name belangrijk om te kiezen voor het model

(seks) waarin het effect van de behandeling het grootste is en de spreiding het kleinste. De keuze voor 'young adult females' is dan ook voornamelijk gebaseerd op het feit dat vrouwelijke muizen gevoeliger zijn voor influenza infectie dan mannelijke muizen. Vrouwen (zowel muizen als mensen) hebben een sterkere humorale immuunrespons, zoals onder andere beschreven voor influenza vaccinatie, waardoor zij met een lagere dosis beschermd zullen zijn tegen influenza virus infectie (Klein 2010, the Lancet Infectious diseases). De eerste experimenten (klinische trials) voor het bepalen van de uiteindelijke dosis in mensen worden echter vaak uitgevoerd in mannen. Dit is ook het moment waarop de transleerbaarheid naar mensen in het algemeen wordt getest. Daarnaast wordt, indien noodzakelijk, voor het gebruik van een vaccin of antiviraal middel in ouderen nog verder onderzoek verricht (dit kan zowel pre-klinisch als klinisch zijn), maar valt buiten de doelstellingen beschreven in deze projectaanvraag.

4. Een deel van het ongerief bij de proefdieren komt voort uit het feit dat zij ziek worden van het influenzavirus en eraan komen te overlijden. Dieren met lichtere verschijnselen blijven relatief lang in leven (Bijlage, D en J). Om hier meer duidelijkheid over te krijgen willen u bovendien verzoeken om de wijze van monitoren (Bijlage, D, Refinement) nog wat te preciseren.

De dieren worden vanaf de dag van influenza infectie twee keer per dag gemonitord op klinische verschijnselen, waarbij iedere ochtend ook het lichaamsgewicht wordt genoteerd. Er wordt hierbij ervoor gezorgd dat er een minimale periode tussen de twee scorings momenten zit om een zo goed mogelijk beeld te krijgen. Wij hanteren het volgende scoringsstelsel voor influenza infectie modellen:

0 = no clinical signs;

1 = piloerection;

2 = piloerection, laboured respiration;

3 = piloerection, laboured respiration, hunched posture;

4 = piloerection, laboured respiration, hunched posture, lethargic and/or thin;

5 = death.

Deze observaties worden per individueel dier ingevoerd door ervaren biotechnici, die specifiek getraind zijn in het scoren van signs bij influenza infectie. De study director houdt deze signs in de gaten en daarnaast zullen de biotechnici zelf bij afwijkende observaties (bijvoorbeeld een dier dat langdurig ziek blijft en qua lichaamsgewicht niet aankomt) de study director waarschuwen. Er zal dan worden gekeken of het dier uit ethische overwegingen eerder opgeofferd kan worden of dat er andere maatregelen genomen kunnen worden om het lijden tot een minimum te beperken.

5. In de NTS, die overigens duidelijk geschreven is, vragen we ons af of bij 3.4 de formulering "waardoor de dieren zich niet lekker zullen voelen en minder eetlust zullen krijgen" recht doet aan de mate van ongerief zoals beschreven in de bijlage en aan het feit dat een deel van de dieren aan de verschijnselen van het influenzavirus zal overlijden.

Ik ben het ermee eens dat deze zin niet geheel duidelijk is over de mate van ongerief en heb deze gespecificeerd door de zin te veranderen in: 'waardoor de dieren griepverschijnselen zullen ontwikkelen, wat zich onder andere uit in dat de dieren zichzelf minder goed verzorgen en in gewichtsverlies door verminderde eetlust'.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van DEC TNO)

- Aard expertise 1: voorzitter van een andere DEC
- Deskundigheid expert: proefdierdeskundige met ervaring met het maken van afwegingen inzake influenzamodelen
- Datum verzoek: 16-5-2017
- Strekking van het verzoek: Wij hebben in het verleden uitgebreid met onderzoekers gesproken over de juiste parameter (de dood als eindpunt), om de effectiviteit van een behandeling tegen Influenza te bepalen. Nu ligt een dergelijke aanvraag opnieuw voor en willen we graag verifiëren of er inmiddels ontwikkelingen zijn met betrekking tot de juiste parameter en advies hoe u aankijkt tegen het combineren van dit eindpunt met een humaan eindpunt.
- Datum expertadvies: 16-5-2017
- Advies expert: Er is op dit moment nog geen andere voorspellende waarde te vinden voor de effectiviteit van een behandeling. Het streven zou zijn om te werken naar een betere voorspeller voor de immunogeniciteit van een behandeling. Helaas is deze voorspeller nog niet beschikbaar. Met ieder ander eerder eindpunt (en de vergunninghouders waar ik mee te maken heb gehad zijn hier intensief mee bezig) zal het zo zijn dat een behandeling mogelijk ten onrechte uit de ontwikkeling wordt gehaald.

- Aard expertise 2: Hoogleraar alternatieven voor dierproeven
- Deskundigheid expert: proefdierkunde, toegepaste immunologie
- Datum verzoek: 24-4-2017
- Strekking van het verzoek: een jaar of 2 geleden ben ik bij je langs geweest om je expertise te vragen met betrekking tot influenzastudies in muizen. Nu ligt er opnieuw een projectvoorstel bij onze DEC en wij willen graag even bij jou verifiëren of er inmiddels ontwikkelingen zijn met betrekking tot de juiste parameter. Opnieuw wordt de dood als eindpunt aangevoerd en het feit dat andere parameters niet voldoende informatie geven over de werkzaamheid van een vaccin. Kun je ons adviseren over de wetenschappelijke of wettelijke noodzaak voor dit meetpunt (dood) en hoe het staat met de ontwikkelingen op dit gebied?
- Datum expertadvies: 21-5-2017
- Advies expert: Dieren zouden gedood dienen te worden bij ernstige klinische verschijnselen. Bij influenza zal dat lethargie zijn, gewichtsverlies, ademhalingsproblemen (bijvoorbeeld pompemde ademhaling), sociale isolatie. Ik zou als DEC eisen dat de verantwoordelijk onderzoeker humane eindpunten benoemt. Deze moeten dan wel goed gedefinieerd worden en door de observanten eenduidig worden afgelezen.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het gaat om experimenten rond de evaluatie van influenzavaccins, met een duidelijke strategie en opzet. De leden van DEC TNO onderschrijven allemaal het belang van het testen van producten om influenza te behandelen en te voorkomen. DEC TNO heeft in een vergadering aangaande dit project, maar ook in eerdere vergaderingen met aanvragen rond dit thema, uitgebreid gediscussieerd over de gebruikte strategie van dit type experimenten. In de voorliggende projectaanvraag zien wij de samenhang in de type experimenten die zullen vallen binnen deze projectaanvraag. En door de strategie die is beschreven in 3.4.1 is DEC TNO ervan overtuigd dat enkel en alleen producten met als doel het voorkomen of het behandelen van influenza worden getest in de beschreven experimenten. Daarbij zien wij dat, door de verschillende subtypen van de influenzastam op te nemen in één aanvraag, de aanvrager het mogelijk heeft gemaakt om met de experimenten beschreven in dit project, ook producten met een brede beschermingspotentie te evalueren .

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en). De hoofddoelstelling is volledig gericht op translationeel onderzoek. De experimenten zoals beschreven hebben altijd als doel om producten te ontwikkelen die transleerbaar zijn voor humaan gebruik. Daarbij is ook in het antwoord op vraag 3 aangegeven dat deze experimenten zich bevinden in de vroege fase van ontwikkeling en dat de transleerbaarheid naar de eigenlijke gebruikers van deze producten in een later stadium wordt onderzocht.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is bijdragen aan de ontwikkeling van vaccinatiestrategieën en antivirale medicijnen tegen verschillende vormen van influenza. Het uiteindelijke doel van het project is het verminderen van de bedreigingen die influenzavirussen vormen voor gezondheid en welzijn. DEC TNO is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: toekomstige influenzapatiënten en de proefdieren die erbij betrokken zijn, namelijk muizen. Daarnaast is de samenleving als geheel belanghebbende: bij influenzapandemieën kan kunnen gehele samenlevingen ontwricht raken. Uiteraard zijn de onderzoekers ook belanghebbende, maar hun belang is relatief klein. De opdrachtgevers voor dit soort studies zijn ook belanghebbende omdat zij belang hebben bij informatie over hun product om het vervolgens te kunnen verzilveren. Dit is een reëel belang, af te leiden aan het feit dat deze partijen investeren in dit type dierproeven. Voor de patiënten zijn in het geding: leven, gezondheid, welzijn, activiteiten kunnen ontplooiën. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn, zijn: leven, gezondheid en welzijn. Voor de samenleving gaat het om het de veiligheid met betrekking tot de dreiging van influenzavirussen en het welzijn van de bevolking.
6. DEC TNO ziet geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken en onderschrijft dat de genoemde beveiligingsniveaus voor het werken met dit soort virussen geschikt zijn om het milieu te beschermen

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De haalbaarheid wordt uitgebreid beargumenteerd in het antwoord op vraag 2. DEC TNO heeft uitgebreid gediscussieerd over het verfijnen van de studies binnen dit project. Wij hebben daar ook vragen over gesteld aan de onderzoeker. In het antwoorden op vraag 1a zien wij de moeite die deze

onderzoeker steekt in het kritisch kijken naar eigen modellen. Daarbij wordt een interne strategie beschreven met betrekking tot kennisoverdracht en discussie, en tevens een werkgroep, waarbij ook biostatistische expertise wordt ingewonnen. Daarmee borgt een onderzoeker steeds te werken aan mogelijke verfijningen in dit project op het gebied van de dood als eindpunt.

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. DEC TNO heeft zeer uitgebreid gesproken over de voorgestelde experimentele opzet en in het bijzonder over de belangrijkste uitkomstparameter die opgevoerd wordt in de experimenten: de dood als eindpunt. Wij zijn ervan overtuigd dat informatie over het overleven van dieren een geschikte parameter is om de onderzoeksvragen binnen dit project te kunnen beantwoorden. Wij hebben als commissie wel de vraag gesteld of deze parameter niet vervangen zou kunnen worden door een voorspeller van de dood. Deze vraag hebben wij als commissie een aantal jaar geleden (destijds nog voor een DEC-aanvraag) ook gesteld aan de onderzoeker. Dit heeft toen geleid tot een uitgebreide uitleg en discussie tussen de onderzoeker en DEC TNO. Ditmaal hebben we opnieuw deze vraag gesteld aan de onderzoeker (1b) met daarbij specifiek de vraag of deze parameter ook in de vroege ontwikkelfase zo cruciaal is. De onderzoekers hebben deze vraag beantwoord, deze informatie in de appendix verwerkt en ook nog geïllustreerd met een aantal artikelen. De antwoorden van de experts onderschrijven de moeite die DEC TNO heeft met dit eindpunt, en hebben ertoe geleid dat, hoewel DEC TNO akkoord gaat met deze parameter, de noodzaak van verfijning met betrekking tot deze parameter niet meer kan worden genegeerd. DEC TNO doet dan ook de suggestie voor een voorwaarde die ertoe zal leiden dat in een jaarlijkse retrospectieve analyse, de Instantie voor Dierenwelzijn, de CCD en de op dat moment beoordelende ethische commissie, de noodzaak van deze parameter objectief kunnen beoordelen. Ook adviseert DEC TNO een gemotiveerde afstemming met de Instantie voor Dierenwelzijn per experiment voor het toepassen van de dood als eindpunt, gerelateerd aan de fase van ontwikkeling of de mogelijke toepassing van het product.

Welzijn dieren

9. 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)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU-richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief is door de onderzoeker ingeschat als licht tot ernstig, waarbij de handelingen ingeschat worden als licht tot matig en het ondergaan van een influenza-infectie van licht tot ernstig. In het scoringssysteem voor het inschatten van het ongerief van een influenza-infectie, dat naar aanleiding van vraag 4 in de aanvraag is opgenomen, is expliciet weergegeven welke symptomen van de influenza-infectie tot een bepaalde inschatting van het ongerief leiden. Dit is naar de mening van de commissie goed geclassificeerd. De handelingen zijn expliciet uitgeschreven in A van de aanvraag, en DEC TNO kan zich vinden in het inschatten van het cumulatief ongerief op basis van de handelingen die per experiment gecombineerd zullen worden. Daarbij kan DEC TNO zich vinden in de verdeling in percentages van het ongerief zoals omschreven in de NTS.
12. De integriteit van de dieren wordt aangetast in die zin dat ze als proefdier worden gebruikt en worden gedood. Er is geen andere aantasting van de integriteit van het dier.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De discussie in de DEC TNO heeft zich voornamelijk toegespitst op de noodzaak van de dood als humaan eindpunt en het ongerief daar daarbij komt kijken. De argumentatie van de aanvrager m.b.t. tot de noodzaak hiervan heeft de commissie, na consultatie van experts, als bevredigend beoordeeld. Zie hiervoor ook de vragen A9 en A10.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. In onderdeel 3.1 van de aanvraag beargumenteert de aanvrager dat er na een primaire screening in vitro altijd wordt overgegaan op een in vivo screening. Deze in vivo stap is noodzakelijk omdat de interactie tussen het immuunsysteem, het virus en het antivirale middel niet in vitro kan worden onderzocht. Daarbij ligt de focus van de in vivo fase juist ook op de toedieningsroute, adjuvantia en dergelijke, de dosering, bijwerkingen en effectiviteit van een antivirale strategie. DEC TNO is ervan overtuigd dat hier inderdaad nog dierstudies voor nodig zijn.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Deze bestaat onder andere uit een poweranalyse per experiment en een analyse van mogelijkheden tot reductie ten opzichte van het door de klant gevraagde aantal.

16. DEC TNO heeft uitgebreid gesproken over verfijning. We hebben deze discussie beschreven bij vraag 7 en 8. De conclusie is dat het project in de ogen van DEC TNO wel in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De onderzoekers geven aan actief op zoek te zijn naar alternatieve parameters om te gebruiken in plaats van de dood als eindpunt. DEC TNO is wel van mening dat hier echt steeds aandacht voor moet zijn en heeft derhalve een voorwaarde geformuleerd bij dit project. Los van deze discussie beschrijven de onderzoekers dat zij gebruik maken van de richtlijnen zoals beschreven door Diehl en collega's. De onderzoekers beschrijven de monitoringsfrequentie voor zieke dieren en de maatregelen die zij nemen om het ondergaan van een influenza infectie door een muis waar mogelijk te verzachten door voer en water in de kooi aan te bieden.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek. Maar indien een dossier wordt gemaakt zullen de experimenten wel onderdeel kunnen vormen van een regulatorisch dossier.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Er zullen in bijlage 1 alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden. De aanvrager heeft dit in voldoende mate wetenschappelijk onderbouwd. De reden is dat vrouwelijke muizen sterker reageren op influenza en daardoor de kenmerken duidelijker tonen. DEC TNO is ervan overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijk dieren uit te voeren. Hiermee voorkomen zij dat er niet meer dieren gebruikt worden dan strikt noodzakelijk in experimenten die ook ernstig ongerief kunnen veroorzaken. DEC TNO heeft de aanvrager tevens bevraagd op de leeftijd van de dieren, en DEC TNO vindt het in het stadium van de ontwikkeling van een vaccin verantwoord dat het diermodel niet een best mogelijke weergave is van de humane populatie die baat heeft bij deze middelen (ouderen), maar dat de modellen gekozen worden die zo veel mogelijk informatie geven over de werking van de middelen in relatie tot het virus en de immunrespons.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Door de besmetting met influenza kunnen zij niet opnieuw gebruikt worden. Organen zullen in sommige gevallen worden onderzocht ten behoeve van de experimenten. De dieren worden gedood volgens bijlage IV van de EU-richtlijn.
20. Omdat in het projectvoorstel specifieke muizen worden aangevraagd, zullen naïeve dieren die nodig zijn voor dit soort experimenten niet beschikbaar zijn. Derhalve is de vraag over hergebruik hier in de ogen van DEC TNO niet van toepassing.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en is begrijpelijk geformuleerd. De commissie heeft een vraag gesteld over de weergave van het ongerief in de

NTS en daarop heeft de aanvrager een aanpassing gemaakt in de NTS, naar tevredenheid van de commissie.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het verbeteren van vaccins voor verschillende typen influenza het ongerief (alle categorieën komen voor) van 9.000 muizen?
2. De waarden die in het geding zijn voor de patiënten, de samenleving en de dieren, zijn alle zeer groot. Influenza kan veel problemen geven op het gebied van welzijn en functioneren, tot en met de dood als gevolg en potentiële ontwrichting van de samenleving bij een pandemie. Bij de experimenten komt veel ongerief kijken voor een groot aantal dieren, met name ook door de dood als eindpunt. Daarom was het voor de commissie een moeilijke afweging.
3. De commissie is van mening dat het belang van de patiënten en de samenleving als geheel zwaarder weegt dan het belang van de proefdieren. Influenza brengt veel negatieve gevolgen met zich mee, van ongemak tot en met de dood en ontwrichting van de samenleving. Door de besmettelijkheid kunnen zich pandemieën voordoen. Het is aannemelijk dat het onderzoek binnen dit project kan bijdragen aan het voorkomen of verminderen van een aantal negatieve effecten van influenza. Hoewel het ongerief voor een groot aantal proefdieren zich (mede) in de hogere categorieën bevindt, weegt het belang van de samenleving en de patiënten zwaarder. Het belang van het onderzoek is groot, en het is aannemelijk, door de opzet en strategie van het project en de deskundigheid van de uitvoerenden, dat er een substantiële bijdrage kan worden gedaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 DEC TNO adviseert de vergunning te verlenen.

X DEC TNO adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

Aangezien deze experimenten ook ernstig ongerief betreffen zal er een retrospectieve analyse gedaan moeten worden. DEC TNO zou als voorwaarde willen stellen dat gedurende het gehele project jaarlijks, per experiment, een analyse wordt gemaakt met betrekking tot de vraag of striktere humane eindpunten tot een andere uitkomst zouden hebben geleid. Daarbij zou de ethische commissie per experiment expliciet willen kunnen beoordelen of het aan- of afwezig zijn van lethargie, gewichtsverlies, ademhalingsproblemen (bijvoorbeeld pompemde ademhaling) en sociale isolatie van invloed zou kunnen zijn geweest op de uiteindelijke overall conclusie.

Aangezien DEC TNO ervan overtuigd is dat de dood als eindpunt in deze experimenten meestal nodig is, maar misschien niet altijd, zouden wij de voorwaarde willen stellen van een

gemotiveerde afstemming met de Instantie voor Dierenwelzijn per experiment voor het toepassen van de dood als eindpunt. Dit gerelateerd aan de fase van ontwikkeling of de mogelijke toepassing van het product.

DEC TNO adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn dilemma's naar voren gekomen met betrekking tot de dood als eindpunt voor deze proeven. Deze hebben wij uitgebreid beschreven in het bovenstaande advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Triskelion BV

Postbus 844

3704 HE ZEIST



**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
AVD5040020171964

Bijlagen

2

Datum 1 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 mei 2017. Het gaat om uw project "Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5040020171964. 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).

Datum:

1 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5040020171964

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

1 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5040020171964

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50400
Naam instelling of organisatie: Triskelion BV
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 51382997
Postbus: 844
Postcode en plaats: 3704 HE ZEIST
IBAN: NL101NGB0654470189
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Triskelion B.V.

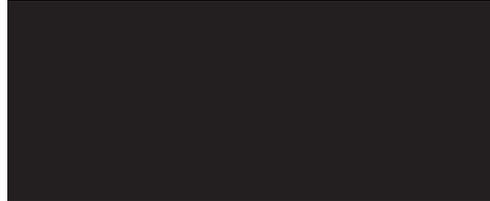
Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 
Functie: 
Afdeling: 
Telefoonnummer: 
E-mailadres: 

Datum:
1 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD5040020171964

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:
Functie:
Afdeling:
Telefoonnummer:
E-mailadres:



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 2018

Geplande einddatum:

1 januari 2023

Titel project:

Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection.

Titel niet-technische samenvatting:

Onderzoek voor de ontwikkeling van producten ter behandeling van en bescherming tegen griep.

Naam DEC:

DEC-TNO

Postadres DEC:

96800 2509 JE DEN HAAG

E-mailadres DEC:



Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1035,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:

Functie:

Plaats:

Datum:



Den Haag

31 mei 2017

Datum:

1 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5040020171964



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Triskelion BV T.a.v Crediteurenadministratie
Postbus 844
3700 AV ZEIST


**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
AVD5040020171964
Bijlagen
2

Datum 1 juni 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 1 juni 2017
Vervaldatum: 1 juli 2017
Factuurnummer: 171964
Ordernummer: Triskelion bestelnummer 56001154

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5040020171964	€ 1035,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 19 juni 2017 20:56
Aan: [REDACTED] info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD5040020171964

Categorieën: Dossier [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Dank voor het consulteren van de ethische commissie nu er onduidelijkheid is ontstaan bij jou. Graag lichten we dit nog toe.

Zoals je in het advies hebt kunnen lezen hebben wij zeer uitgebreid gediscussieerd over de belangrijkste uitleesparameter die aangevoerd wordt in dit project. Namelijk het al dan niet overleven van de influenza infectie. Wij hebben deze discussie zo uitgebreid mogelijk weergegeven in het advies. Het al dan niet toepassen van verlichtende middelen tegen de infectie hangt hier nauw mee samen. Omdat dit direct van invloed zal zijn op deze uitleesparameter. Wij hebben gezien het antwoord van de onderzoekers dat passend is in deze strategie hier geen bijzonderheden gesignaleerd. Discussies raken vaak meer dan 1 onderdeel van het advies omdat we nu veel specifieke vragen moeten beantwoorden. We begrijpen dat we het hokje hadden moeten aankruisen. We hopen dit hiermee verhelderd te hebben.

Groet [REDACTED]

[REDACTED] DEC TNO

From: info@zbo-ccd.nl [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Sent: Friday, 16 June, 2017 15:43

To: [REDACTED]

Subject: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD5040020171964

Geachte DEC-TNO,

Op 31-05-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection.' met aanvraagnummer AVD5040020171964.

De aanvrager geeft aan dat er niet altijd pijnbestrijding wordt toegepast. In uw advies geeft u onder C9 aan dat er geen bijzonderheden zijn. Kunt u dit toelichten en of het niet toepassen van pijnbestrijding is meegenomen in de ethische afweging?

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Triskelion BV

Postbus 844

3704 HE ZEIST



**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

AVD5040020171964

Bijlagen

1

Datum 3 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection." met aanvraagnummer AVD5040020171964. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

De voorwaarde met betrekking tot het onderzoeken van humane eindpunten om de dood als eindpunt te voorkomen is overgenomen van de DEC.

U kunt met uw project "Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

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

Er is sprake van ernstig ongerief.

Datum:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD5040020171964

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-TNO gevoegd. Dit advies is opgesteld op 26 mei 2017. 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. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven

na 

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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: Triskelion BV
Adres: Postbus 844
Postcode en plaats: 3704 HE ZEIST
Deelnemersnummer: 50400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection." met aanvraagnummer AVD5040020171964, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-TNO. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 26 mei 2017, ontvangen op 31 mei 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Influenza virus challenge model				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	9.000	25% Ernstig 50% Matig 25% Licht	

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Aanvraagnummer:
AVD5040020171964

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

Er wordt per experiment met de IvD afgestemd of de dood als eindpunt noodzakelijk is, gerelateerd aan de fase van ontwikkeling of de mogelijke toepassing van het product.

In artikel 10, lid 1 sub a 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Voorafgaand aan ieder experiment wordt door de IvD beoordeeld of er humane eindpunten zoals het aan- of afwezig zijn van lethargie, gewichtsverlies, ademhalingsproblemen (bijvoorbeeld pompemde ademhaling) en sociale isolatie, toe te passen zijn om de dood als eindpunt te voorkomen.



Aanvraagnummer:

AVD5040020171964

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 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 onvereenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:
AVD5040020171964

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b 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 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.