

Inventaris Wob-verzoek W17-11										
nr.	document NTS 2017895	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS initieel			x						
3	Projectvoorstel initeel				x		x			
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 initieel			x						
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 initieel				x		x			
6	Ontvangstbevestiging				x		x			
7	Verzoek om DEC-advies				x		x			
8	Brief aanhouden beoordeling				x		x			
9	DEC-advies				x		x			
10	NTS aangepast	x								
11	Projectvoorstel aangepast				x		x			
12	Bijlage beschrijving dierproeven 1 aangepast			x						
13	Bijlage beschrijving dierproeven 2 aangepast				x		x			
14	Aanvullende vraag aan DEC				x		x			
15	Verzoek om aanvullende informatie				x		x			
16	Bijlage beschrijving dierproeven 1 aangepast			x						
17	Bijlage beschrijving dierproeven 2 aangepast				x		x			
18	Adviesnota CCD		x							x
19	Beschikking en vergunning				x		x			



AVD401002017 895

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	40100
		<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	Stichting Wageningen Research
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	9098104
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	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59
		Postcode en plaats	6700AB Wageningen
		IBAN	NL10 RABO 0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 is verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 7 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 6 - 2019 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | DEC-WUR |
| Postadres | Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen |
| E-mailadres | dec@wur.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee? Verplicht
- Projectvoorstel + 2 bijlagen
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- bestelorder WUR1043283

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	
Plaats	Wageningen
Datum	9 - 3 - 20
Handtekening	

Format
Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
1.2	Looptijd van het project	1-7-2017 - 1-6-2019
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	antilichaam antibioticum therapie Q-koorts

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>Sommige mensen krijgen jaren nadat ze een acute infectie met de Q-koorts bacterie (<i>Coxiella burnetii</i>) hebben opgelopen, chronische Q-koorts. De behandeling van chronische Q-koorts bestaat uit het langdurig gebruik van antibiotica, tot wel vier jaar. Het afremmen van de groei van de bacterie is echter vaak problematisch en soms zijn er extra antibiotica nodig om te proberen de groei van de bacterie volledig tot stilstand te brengen. Naast de ongewenste bijwerking van het langdurig gebruik van antibiotica voor de patiënt, leidt de continue blootstelling van de darmflora aan de antibiotica tot de ontwikkeling en verspreiding van antibiotica resistente genen. Een probleem dat ernstige proporties begint aan te nemen en niet onderschat mag worden. Meer effectieve en gerichte therapieën ter bestrijding van de Q-koorts bacterie zouden kunnen bijdragen aan een kortere behandeling van chronische Q-koorts.</p> <p>Dit onderzoek vloeit voort uit de ontwikkeling van de huidige op antilichamen gebaseerde kanker medicijnen. Een aantal van de recent ontwikkelde kanker medicijnen heeft de eigenschap zowel specifiek als zeer efficiënt de tumor aan te vallen, met relatief weinig bijverschijnselen voor de patiënt. Deze nieuwe medicijnen bestaan uit antilichamen gekoppeld aan toxische stoffen, die alleen in de tumor effectief zijn. Een vergelijkbare benadering, waarbij een antilichaam de antibiotica naar de geïnfecteerde cellen brengt is reeds gepatenteerd voor behandeling van infecties met de ziekenhuisbacterie MRSA.</p> <p>Met dit onderzoek willen we antwoord krijgen op de volgende vraag: Kunnen we door gebruikt te maken van de huidige kennis waaronder ontwikkelingen in gerichte kanker therapieën antilichaam-antibioticum conjugaat medicijnen ontwikkelen voor de behandeling van acute en vooral chronische Q-koorts infecties.</p>
3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	<p>De antilichaam-antibioticum conjugaat therapie zou een ideale behandeling van Q-koorts kunnen zijn. De antibiotica komt alleen terecht daar waar het nodig is wat leidt tot minder bijwerkingen en antibiotica resistentie verspreiding. Het is meer effectief omdat antibiotica aan het antilichaam kan worden gekoppeld en zo gericht naar de geïnfecteerde cel kan worden geleid. Deze eigenschappen kunnen mogelijk leiden tot een betere en kortere behandeling van chronische Q-koorts.</p>
3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	<p>muis, n=750</p>

3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	de muizen zullen door middel van injectie geïnfecteerd worden en de behandeling krijgen. De infectie verloopt in het gekozen model zonder waarneembare ziekteverschijnselen, ook als geen behandeling wordt ingesteld.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	licht ongerief: 300; matig ongerief: 450
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	dieren worden geëuthanaseerd aan het eind van de proef

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	voorafgaand aan dit experiment zijn uitgebreide proeven gedaan in in vitro cel systemen om te bepalen hoe goed de nieuwe medicijnen in cellen bacteriën kunnen doden. De meest veelbelovende medicijn kandidaten zijn geselecteerd voor de dierproef. De evaluatie of het ontwikkelde medicijn via de bloedsomloop geïnfecteerd cellen in organen kan bereiken en daar bacteriën in geïnfecteerd cellen kan doden kan alleen in een diermodel getest worden.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Reductie van het aantal te testen medicijnen doordat voorafgaand aan dit experiment uitgebreide proeven gedaan zijn in in vitro cel systemen om te bepalen hoe goed de nieuwe medicijnen in cellen bacteriën kunnen doden. Van deze medicijnen wordt vervolgens in de dierproef de veiligheid bepaald. Voor de veilige medicijnen wordt de optimale dosis bepaald. De meest veelbelovende medicijn kandidaten zijn geselecteerd voor de dierproef met Q koorts infectie. Op basis van eerdere ervaring met het infectiemodel en technisch vergelijkbare behandelingsstudies is de optimale groepsgrootte bepaald.

- 4.3 **Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
- Het gekozen muismodel is het meest verfijnde model omdat het een kort durend model is waarbij de muizen na infectie geen waarneembare ziekteverschijnselen ontwikkelen. Daardoor blijft het ongerief voor de dieren beperkt. Op deze manier kan snel en effectief een selectie gemaakt worden van antilichaam-antibiotica conjugaten die doorontwikkeld kunnen worden als medicijnen voor mensen met Q-koorts.
- 4.4 Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.
- De dieren worden gehouden in groepshuisvesting met verrijking van de omgeving. Het aantal handelingen met de dieren die mogelijk stress op kunnen leveren is tot een minimum beperkt. De dieren wordt door deskundige verzorgers frequent geobserveerd zodat indien nodig direct actie kan worden ondernomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Form Project proposal

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

1 General information

- | | | |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 40100 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Wageningen Research |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
<input type="checkbox"/> 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.
-

De verwekker van Q-koorts, *C. burnetii* is een obligaat intracellulair pathogeen die zich met name verschuilt in macrofagen en macrofaag-achtige cellen in het lichaam. Blootstelling aan *Cb* kan leiden tot of acute of chronische infecties in mensen. Acute Q-koorts wordt in verband gebracht met lever en long-ontsteking. Chronische Q-koorts ontwikkelt zich over een periode van maanden tot jaren na de initiële infectie en wordt voornamelijk gekarakteriseerd door hartklepontsteking (endocarditis) of bloedvatontsteking (endovasculaire infectie). Hoewel slechts een klein percentage (2-5%) van de geïnfecteerde individuen chronische Q-koorts ontwikkelt, is de belasting van deze groep patiënten erg groot omdat langdurige behandeling met antibiotica nodig is om mortaliteit te voorkomen. Mortaliteit kan oplopen tot wel 60% wanneer chronische Q-koorts niet wordt behandeld. Naast de noodzaak van krachtigere antibiotica om acute Q-koorts te behandelen, zijn er vooral betere antibioticum behandelingen nodig voor chronische Q-koorts, één van de prioriteiten zoals vermeld in het rapport van de stichting Q-support.

De huidige antibiotica behandeling van Q-koorts patiënten die zijn geïnfecteerd met slechts één enkele pathogene bacterie – *C. burnetii* – toont vele overeenkomsten met chemotherapie ter behandeling van kanker: in beide gevallen wordt het hele lichaam bloot gesteld aan het medicijn, terwijl een relatief kleine populatie cellen (bacterie geïnfecteerde cellen/kanker cellen) het doel zijn. In het geval van kanker heeft de chemotherapie ernstige bijwerkingen voor de patiënt, in het geval van Q-koorts geeft de langdurige behandeling niet alleen bijwerkingen voor de patiënt, maar draagt het ook bij aan de problematische opkomst van antibiotica resistentie. Door continue blootstelling van de darmflora aan de antibiotica, ontstaan er antibiotica resistente bacteriën die bijdragen aan het als maar toenemende wereldwijde probleem van antibiotica resistentie. In beide gevallen zijn betere medicijnen, die specifiek de ziekte-veroorzakers aanpakken, wenselijk. Ons doel is om een eerste stap te zetten in de ontwikkeling van meer specifieke en krachtigere antibiotica ter behandeling van acute en vooral chronische Q-koorts.

Een aantal medicijnen die recentelijk zijn ontwikkeld ter behandeling van kanker hebben deze wenselijke eigenschappen. Antilichaam therapieën hebben de behandeling van kanker de laatste 20 jaar gerevolutioneerd. Deze antilichamen zijn ontwikkeld tot dragers van medicijnen om cytostatische medicijnen specifiek af te geven in tumoren. De antilichamen binden specifiek aan moleculen op de tumor cel en geven zo gericht de cytostatische medicijnen af waar ze werken moeten. Deze recent geïntroduceerde Antibody Drug Conjugates (ADC), Adcetris en Kadcyła, voor de

behandeling van respectievelijk Hodgkin lymphoma en HER2 positieve borstkanker zijn effectiever dan chemotherapie en hebben minder bijwerkingen. Recent is aangetoond dat conjugatie van antibiotica in plaats van cytostatische drugs aan antilichamen een veel belovende stap zou kunnen zijn voor de behandeling van multi-drug resistente Staphylococcus aureus (de ziekenhuis bacterie MRSA). (Lehar 2015) Door zijn obligate intracellulaire levensstijl is Cb een perfecte kandidaat voor een Antilichaam Antibiotica Conjugaten (AAC). Omdat het intracellulaire volume beperkt is, bereikt een relatief kleine hoeveelheid doelgerichte antibiotica snel voldoende concentratie in de cel om het pathogeen te elimineren. AAC kunnen krachtigere antibiotica naar de plaats van infectie brengen, om zowel op effectievere wijze de Q-koorts bacterie C. burnetii te elimineren als de ontwikkeling en verspreiding van antibioticum resistentie in de darmflora van de patiënt te voorkomen. De lange half-waarde tijd van antilichamen (30 dagen) in vergelijking met antibiotica (gemiddeld 3 uur) kan mogelijk leiden tot een verminderde doseringsfrequentie. Effectievere behandeling kan ook tot een kortere behandelingsduur van de Q-koorts patiënt leiden.

Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, DePalatis L, Raab H, Hazenbos WL, Morisaki JH, Kim J, Park S, Darwish M, Lee BC, Hernandez H, Loyet KM, Lupardus P, Fong R, Yan D, Chalouni C, Luis E, Khalfin Y, Plise E, Cheong J, Lyssikatos JP, Strandh M, Koefoed K, Andersen PS, Flygare JA, Wah Tan M, Brown EJ, Mariathasan S. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular S. aureus. Nature. 2015 Nov 19;527(7578):323-8. doi: 10.1038/nature16057.

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?

Dit onderzoeksvoorstel heeft één algemeen doel: Het ontwikkelen van Antilichaam Antibiotica Conjugaten (AAC) voor een effectieve behandeling van Q-koorts. In de eerste fase van het project ligt de focus op het identificeren van het juiste antigeen en in vitro validatie. De geselecteerde AAC moeten veilig en effectief zijn tegen Cb in vivo. In de tweede fase van het project zullen deze resultaten daarom in vivo getest worden door het toepassen van de in vitro geteste AAC in het Q-koorts infectie muizen model. Door combinatie van bestaande expertise met betrekking tot de ontwikkeling van AAC, in vitro effectiviteit en kennis van en ervaring met het Q-koorts infectie model in muizen wordt de haalbaarheid van het project hoog geacht.

3.3 Relevance

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

Wetenschappelijk belang: ontwikkeling van AAC als mogelijke therapie tegen intra-cellulaire bacteriële infecties is een nieuwe ontwikkeling waarmee antibiotica effectiever ingezet kunnen worden met minder bijwerkingen door lagere doseringen en doseringsfrequentie; en minder risico op resistentie ontwikkeling.

Maatschappelijk belang: Chronische Q-koorts is erg belastend voor patiënten omdat nu langdurige behandeling met antibiotica nodig is om mortaliteit te voorkomen. Mortaliteit kan oplopen tot wel 60% wanneer chronische Q-koorts niet wordt behandeld. Naast de noodzaak van krachtigere antibiotica om acute Q-koorts te behandelen, zijn er vooral betere antibioticum behandelingen nodig voor chronische Q-koorts, één van

de prioriteiten zoals vermeld in het rapport van de stichting Q-support. Antibiotica Antilichaam Conjugaten (AAC) kunnen krachtigere antibiotica naar de plaats van infectie brengen, om zowel op effectievere wijze de Q-koorts bacterie *C. burnetii* te elimineren als de ontwikkeling en verspreiding van antibioticum resistentie in de darmflora van de patiënt te voorkomen. Mogelijk kan AAC ook leiden tot een verminderde doseringsfrequentie, en tot een kortere behandelingsduur van de Q-koorts patiënt.

3.4 Research Strategy

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

De eisen voor de ontwikkeling van Antibiotica Antilichaam Conjugaten die effectief antibiotica leveren op de plaats van infectie met *C. burnetii* viervoudig: het molecuul wat herkent wordt door het antilichaam moet op de (macrofaag)cellen voorkomen waar de bacterie zich in vermenigvuldigt, en dat molecuul moet in voldoende mate op de celmembraan aanwezig zijn om genoeg antibiotica af te leveren om *C. burnetii* effectief te doden. Het antilichaam moet specifiek en sterk binden aan het molecuul op de cel om correcte lokalisatie en afgifte van de antibiotica waarborgen. De koppeling die het antilichaam met het antibioticum verbindt moet zorgen voor afgifte van het antibiotica in de nabijheid van het pathogeen, maar tegelijkertijd moet het bescherming bieden tegen ongewenste afgifte in het plasma. Het antibioticum zelf moet voldoende sterk zijn om *C. burnetii* in lage concentraties te doden en actief zijn in een het relatief zure milieu van het fagosoom waar *C. burnetii* verblijft.

Fase 1 van het project is de ontwikkeling van AAC. Dit gedeelte van het project wordt uitgevoerd met behulp van chemische testen en in vitro cel systemen. AAC die in de in vitro systemen aan de bovenstaande eisen voldoen komen in aanmerking voor in vivo testen.

Fase 2 betreft het in vivo testen van geselecteerde AAC zoals beschreven in deze aanvraag.

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.

De in vivo testen richten zich op 2 hoofdonderdelen:

- (1) veiligheid en farmacokinetiek van de AAC: bepalen van een veilige en effectieve dosis en de halfwaardetijd van de AAC in vivo in de muis
- (2) therapeutische effectiviteit in het muis Q-koorts infectiemodel

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

Aan de hand van de in vitro resultaten is een inschatting gemaakt worden van welke dosis in vivo gebruikt moeten worden. Op basis hiervan moet in muizen bepaald worden of de berekende doses veilig zijn of leiden tot bijwerkingen.

In de veiligheidsstudie wordt voor elk te testen conjugaat eerst het antilichaam zonder antibioticum conjugaat getest worden. Als het antilichaam (zonder gekoppeld antibioticum) bijwerkingen laat zien ((acute) klinische verschijnselen en/of lokale ontstekingsverschijnselen in organen op basis van histopathologische analyse) dan zal dit antilichaam en de bijbehorende AAC niet verder getest worden. (Go / No Go)

Van de veilige antilichamen moet bepaald worden wat de halfwaardetijd van de AAC in vivo is in de muis zodat de dosis en het behandelingschema bepaald kunnen worden. Ook hier wordt naast farmacokinetische kenmerken ook de veiligheid van het AAC geëvalueerd. (Go / No Go)
Als de beoogde dosis veilig is voor de muis en zonder bijwerkingen gebruikt kan worden moet de effectiviteit van de AAC bepaald worden. Voor dit doel worden met muizen geïnfecteerd met Cb en vervolgens behandeld met AAC. In deze muizen wordt de effectiviteit van de behandeling bepaald aan de hand van de hoeveelheid Cb die in de milt van de muis aangetoond wordt na sectie.

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	Veiligheid en farmacokinetiek van AAC
2	Therapeutische effectiviteit van AAC

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Veiligheid en farmacokinetiek van AAC

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.

Om te bepalen of het antilichaam-antibioticum conjugaat (AAC) veilig in vivo kan worden toegepast in hoeveelheden die nodig zijn om therapeutische effectiviteit te bereiken moeten veiligheids- en farmacokinetiek studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vindt een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Door de koppeling van de 2 actieve stoffen (antilichaam en antibioticum) is het mogelijk dat de farmacokinetiek (zoals de halfwaardetijd en de klaring) anders is dan van de afzonderlijke stoffen. Dit geldt ook voor mogelijke bijwerkingen. Om deze aspecten te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met verschillende doses van de ontwikkelde AAC. Op 3-5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen.

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

Na 7 dagen acclimatisatie worden per te testen AAC 3 groepen vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd intraveneus geïnjecteerd met antilichaam of antilichaam-antibioticum conjugaat. Het antilichaam-antibioticum conjugaat wordt in 2 doses getest. Deze doses worden bepaald aan de hand van de berekende dosis op basis van gegevens van in vitro studies met cel systemen en een dosis die 10 maal hoger is. Het vrije antilichaam wordt in de hoge doses getest. Op 3-5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat.

Er is gekozen voor deze werkwijze omdat hiermee voorkomen wordt dat er bij de muizen herhaaldelijk via retro-orbitaal punctie bloed afgenomen moet worden. Daarnaast heeft deze methode als voordeel dat op weefselniveau eventuele bijwerkingen vastgesteld kunnen worden van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat. Aangezien de AAC methode zich specifiek richt op macrofagen en andere myeloïde cellen die met name in diverse weefsel voorkomen (en niet in circulatie) geniet deze benadering de voorkeur.

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

Er is gekozen voor sequentieel opofferen van 3 dieren per tijdstip op 3-5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC op basis van bovenstaande redenering, statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over farmacokinetische studies van antilichamen in muizen (Tam 2013).

Tam SH, McCarthy SG, Brosnan K, Goldberg KM, Scallon BJ. Correlations between pharmacokinetics of IgG antibodies in primates vs. FcRn-transgenic mice reveal a rodent model with predictive capabilities. *MAbs*. 2013 May-Jun;5(3):397-405. doi: 10.4161/mabs.23836.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor de Cb challenge en effectiviteitsstudies. Het gebruik van hetzelfde model is belangrijk om de resultaten zo relevant mogelijk te maken voor de vervolg studie (zie bijlage 2)

Voor 1 farmacokinetiek experiment worden maximaal 3 muizen per tijdstip op maximaal 5 tijdstippen gebruikt: 15 muizen (hiermee kan een tijdcurve gemaakt worden waaruit halfwaarde tijd berekend kan worden)

Voor elk te testen conjugaat zal eerst een proef met het antilichaam zonder antibioticum conjugaat uitgevoerd worden. Als het antilichaam zonder antibioticum bijwerkingen laat zien ((acute) klinische verschijnselen en/of lokale ontstekingsverschijnselen in organen op basis van histopathologische analyse dan zal dit antilichaam en de bijbehorende AAC niet verder getest worden. (NoGo)

Voor elk AAC zijn 2 experimenten nodig om verschillende doses te testen voor kinetiek en mogelijke bijwerkingen (veiligheid).

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(15) \times (2) \times (5) = 150$ muizen gebruikt zullen worden.

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.

Vervanging: farmacokinetiek en veiligheid kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening zodat alleen AAC kandidaten die specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven ook daadwerkelijk in dieren getest worden. Vermindering: in de methode gebruikt door Tam et al worden steeds 4 of 5 dieren per tijdstip bemonsterd. Echter de waargenomen spreiding in die data is zo beperkt dat wij in deze proef het aantal dieren per tijdstip terug gebracht hebben tot 3 dieren, hetgeen voldoende moet zijn voor een betrouwbaar resultaat. Verfijning: wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde retro-orbitale punctie uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels.

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

wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde retro-orbitale punctie uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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

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.

De injectie met de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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?

stress door hantering, bijwerking van de AAC

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; de antilichaam component van de AAC is gericht tegen moleculen op de oppervlakte van macrofagen en myeloïde cellen. Deze cellen kunnen ontstekingsverschijnselen veroorzaken als ze in weefsel geactiveerd worden. Bij in vivo toepassing van de AAC zou dit in de context van weefsel ontsteking tot gevolg kunnen hebben ook al is dit stimulerende effect in vitro bij cellijnen niet waargenomen.

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen opzet tot een minimum beperkt; door middel van in vitro vooronderzoek worden AAC ontwikkeld waarvan het onwaarschijnlijk is dat deze tot bijwerkingen zullen leiden; als bijwerkingen zoals ontsteking waargenomen worden is dit een no go voor verdere testen van het betreffende AAC.

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.

muizen die na behandeling op 2 opeenvolgende dagelijkse observaties tekenen van ongerief vertonen die duiden op het optreden van (systemische) ontsteking (opgezet haar, bol zitten, afzonderen, niet reageren op dierverzorger) worden geëuthanaseerd en door middel van histopathologisch onderzoek geëvalueerd.

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

injectie met AAC: licht ongerief euthanasie: licht ongerief cumulatief ongerief indien geen bijwerking optreedt (>98% van de dieren): licht ongerief indien bijwerking optreedt (wat op basis van literatuur, in vitro vooronderzoek en verwachting uitzonderlijk geacht word): matig ongerief (

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de AAC leidt tot ontstekingsverschijnselen in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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

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

Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Therapeutische effectiviteit van AAC

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.

Om te bepalen of het antibioticum-antilichaam conjugaat (AAC) in vivo kan worden toegepast om therapeutische effectiviteit tegen *Coxiella burnetii* (Cb) te bereiken moeten therapeutische effectiviteits studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vind een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Om de preventieve en therapeutische effectiviteit te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met de ontwikkelde AAC in de eerder bepaalde veilige optimale dosis. Hiervoor wordt een challenge model gebruikt waarbij muizen geïnfecteerd worden met Cb na (preventief) of voor (therapeutisch) behandeling met een AAC. Het challenge model dat in eerdere studies gebruikt is. Dit betreft een kort durend infectie model in muizen met een looptijd van 7 dagen waarbij muizen geen klinisch waarneembare symptomen hebben. Virulentie van Cb en ernst van infectie worden in dit model bepaald aan de hand van het gewicht van de muis, de milt van de muis en de Cb load in de milt.

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

Therapeutische effectiviteit: Na 7 dagen acclimatisatie worden vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd geïnfecteerd met ca 10^5 genome copies Cb in max 0,2 ml volume via een intraperitoneale injectie. Op 18-24 uur na infectie worden de muizen intraveneus geïnjecteerd met de vooraf bepaalde dosis AAC in max. 0.2 ml volume (bijlage 1). Afhankelijk van de farmacokinetiek zoals bepaald in bijlage 1 wordt de behandeling met AAC in de periode van 2-6 dagen na infectie maximaal 2 maal herhaald. Controle groepen krijgen een intraveneuze behandeling met fysiologische zoutoplossing, antilichaam zonder antibioticum en vrij antibioticum. Zeven dagen na infectie worden de muizen geëuthanaseerd. De muizen worden gewogen, de milt wordt verwijderd en gewogen en de load van Cb in de milt wordt bepaald als maat voor effectiviteit van de AAC.

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

Er is gekozen voor een eindpunt studie op basis van bovenstaande redenering en statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over therapeutisch effect van AAC tegen *Staphylococcus aureus* infectie in een vergelijkbaar muizen model (Lehar 2015) en het infectiemodel van Cb in Swiss OF1 muizen [REDACTED]. Uit deze studies blijkt een groepsgrootte van n=10 muizen noodzakelijk om met voldoende betrouwbaarheid effectiviteit van AAC tegen Cb infectie in muizen vast te stellen.

Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, DePalatis L, Raab H, Hazenbos WL, Morisaki JH, Kim J, Park S, Darwish M, Lee BC, Hernandez H, Loyet KM, Lupardus P, Fong R, Yan D, Chalouni C, Luis E, Khalfin Y, Plise E, Cheong J, Lyssikatos JP, Strandh M, Koefoed K, Andersen PS, Flygare JA, Wah Tan M, Brown EJ, Mariathasan S. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*. 2015 Nov 19;527(7578):323-8. doi: 10.1038/nature16057.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor eerder beschreven Cb challenge model en de voorafgaande farmacokinetiek studie (zie bijlage 1). Het gebruik van hetzelfde model is belangrijk om de resultaten zo betrouwbaar mogelijk te maken en vergelijkbaar met eerder onderzoek voor wat betreft het Cb challenge model.

Voor 1 effectiviteitsexperiment worden maximaal 10 muizen per challenge groep gebruikt en 4 groepen: controle (behandeld met fysiologisch zout oplossing); alleen 1 malig antilichaam; alleen 1 malig antibioticum en 1 malig AAC. = totaal 40 dieren

Elk AAC wordt getest op werkzaamheid tegen 3 verschillende stammen van Cb; de referentie stam Nine Mile, en 2 gekarakteriseerde veldisolaten van geit resp. rund.

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(40) \cdot (3) \cdot (5) = 600$ muizen gebruikt zullen worden.

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.

Vervanging: effectiviteit kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening en een in vivo veiligheidsstudie (zie bijlage 1) zodat alleen AAC kandidaten die zonder bijwerkingen specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven en Cb afdoden ook daadwerkelijk in Cb geïnfecteerde dieren getest worden Vermindering: op basis van behaalde resultaten in technisch vergelijkbare studies wordt het minimaal aantal dieren gebruikt waarbij een betrouwbaar resultaat te behalen is. Verfijning: het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden.

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

Het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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.

H. Pain and pain relief

De ip injectie met het infectie inoculum en de iv injectie met de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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?

stress door hantering, infectie met Cb

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; intra peritoneale injectie met virulente Cb kan mogelijk in uitzonderlijke gevallen tot ontsteking van de buikholte leiden

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen methode tot een minimum beperkt, er wordt een muizen model gebruikt waar het ontstaan van klinische symptomen uitzonderlijk is, door toepassing van humane eindpunten wordt ernstig ongerief voorkomen

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.

muizen die na behandeling op 2 opeenvolgende dagelijkse observaties tekenen van ongerief vertonen die duiden op het optreden van (systemische) ontsteking (opgezet haar, bol zitten, afzonderen, niet reageren op dierverzorger) worden geëuthanaseerd en door middel van histopathologisch onderzoek geëvalueerd.

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

injectie met AAC: licht ongerief injectie/infectie met Cb: licht ongerief euthanasie: licht ongerief cumulatief ongerief: indien therapeutische effectiviteit optreedt (75% van de dieren): matig ongerief

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de AAC leidt tot therapeutisch effectieve afdoding van Cb in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN



**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
AVD401002017895

Bijlagen

2

Datum 10 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 maart 2017. Het gaat om uw project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002017895. 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:

10 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002017895

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
10 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017895

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100
Naam instelling of organisatie: Stichting Wageningen Research
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 9098104
Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12
Postbus: 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
IBAN: NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Datum:

10 maart 2017

Aanvraagnummer:

1002017895

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juli 2017
Geplande einddatum: 1 juni 2019
Titel project: Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
Titel niet-technische samenvatting: Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
Naam DEC: DEC-WUR
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: Wageningen
Datum: 9 maart 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University and Research Concernstaf+
t.a.v. Crediteurenadministratie
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB WAGENINGEN


**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
AVD401002017895
Bijlagen
2

Datum 10 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 10 maart 2017
Vervaldatum: 9 april 2017
Factuurnummer: 170895
Ordernummer: WUR1043283

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002017895	€ 1.287,00

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.

[REDACTED]

Van: DEC WUR <dec@wur.nl>
Verzonden: maandag 13 maart 2017 10:31
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
Onderwerp: RE: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD401002017895

L.S.,

Dit project wordt 20-3 in de DEC behandeld.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van de [REDACTED] is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

From: info@zbo-ccd.nl [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: vrijdag 10 maart 2017 11:28
To: DEC WUR
Subject: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD401002017895

Geachte leden van DEC-WUR

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" en aanvraagnummer: AVD401002017895.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het

gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van de beveiligde verbinding.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 10-03-2017, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager kan de termijn worden opgeschort. U dient de CCD zo spoedig mogelijk op de hoogte te stellen van deze opschorting. Zodra de opschortende termijn is beëindigd, stelt u de CCD hiervan onverwijld op de hoogte. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt.

Met vriendelijke groeten,

CCD



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**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
AVD401002017895

Datum 10 maart 2017

Betreft Vervolg aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 10 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" met aanvraagnummer AVD401002017895.

DEC advies gevraagd

Uw aanvraag is naar DEC-WUR gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.



Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Wageningen
University & Research

DATUM
9 mei 2017

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002017895

ONS KERMERK
AVD401002017895

POSTADRES
[Redacted]

BEZOEKADRES
[Redacted]

INTERNET
www.wur.nl

KVK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
[Redacted]

TELEFOON
[Redacted]

E-MAIL
DEC@wur.nl

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002017895**
2. Titel van het project: Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
3. Titel van de NTS: Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[Redacted]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 08-03-2017
Aanvraag compleet: 08-03-2017
In vergadering besproken: 20-03-2017
Anderszins behandeld: schriftelijke ronde 20-04-2017
Termijnonderbreking(en) van 21-03-2017 tot 19-04-2017
Aanpassing aanvraag: 19-04-2017
Advies aan CCD: zie datum brief
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
9. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 21-03-2017
Gestelde vragen en antwoorden:
 - De kennis en kunde van deze onderzoeksgroep is, afgaande op het geschreven voorstel en oordeel nog niet voldoende gewaarborgd in de ogen van de DEC. De DEC is van mening dat men voldoende kennis en kunde heeft om de proef technisch goed uit te voeren, maar kan niet goed beoordelen of men voldoende samenwerking heeft met partijen buiten de proefdierwereld, in de klinische/humane geneeskunde waardoor de resultaten in de toekomst vertaalbaar zijn naar mensen.
Dit onderzoeksvoorstel hoort bij een project wat loopt bij een universitair research laboratorium waar de AAC ontwikkeld worden. Dit project is gehonoreerd door de Nederlandse belangen organisatie voor chronische Q-

koorts patiënten. Deze organisatie is in hoge mate gericht op het subsidiëren van projecten die op kortere of langere termijn een bijdrage kunnen leveren aan de betere behandeling van chronische Q koorts patiënten. Vanwege de contacten en de rapportage cyclus is er dus nauwlettend toezicht op dit project en de mogelijkheden tot translatie. Daarnaast heeft de onderzoeksgroep op basis van onderzoek tijdens de Q-koorts uitbraak in Nederland nauwe contacten met onder andere het universitair medisch centrum wat de zorg voor chronische Q-koorts patiënten uitvoert en coördineert. Via dit bestaande netwerk borgen wij de samenwerking met partijen buiten de proefdierwereld en spelen wij een actieve rol in het meedenken over oplossingen die voor patiënten relevant kunnen zijn of worden.

- De DEC is van mening dat het project te algemeen beschreven is. Zij heeft hierover de volgende vragen:
 - Wat maakt dat de resultaten vertaalbaar is naar de mens?
Voor dit specifieke in ontwikkeling zijnde medicijn is deze dierproefstudie de eerste stap van in vitro naar in vivo. Dit is een essentiële stap omdat in een in vitro systeem het medicijn en de cellen direct met elkaar in contact kunnen komen. In een dergelijk systeem werkt het medicijn in zowel dierlijke als humane cellen. In een in vivo situatie wordt het medicijn in de bloedbaan ingebracht en moet vervolgens de bloedbaan verlaten om bij de relevante cellen te komen die niet vrij in de bloedbaan bewegen maar in orgaanweefsel zitten. De huidige aanvraag is er dus op gericht om die vraag te beantwoorden en de muis is een goed model hiervoor omdat het mechanisme van verdeling van de AAC in de bloedbaan en de weefsel grote overeenkomsten vertoont met het mechanisme in de mens. Als de AAC inderdaad in de doelcellen in het weefsel aankomt en werkt tegen de bacterie zonder dat bijwerkingen optreden dan is dat een belangrijke set aan data die gebruikt kunnen worden in aanvragen die de opdrachtgever wil doen om toestemming te krijgen om het medicijn te gaan testen in 'clinical trials' met mensen. Varianten van deze combinatie medicijnen (een werkzame stof gekoppeld aan een antilichammolecuul) zijn succesvol getest in muizenmodellen om vervolgens in te stromen in humane 'clinical trials' en de eerste varianten hiervan zijn, zoals vermeld in de aanvraag, recent op de markt gekomen.
 - Waarom is dit een goed model?
De muis is een goed model om te testen of het medicijn vanuit de bloedbaan de doelcellen in weefsel kan bereiken omdat het mechanisme van verdeling van de AAC in de bloedbaan en de weefsel grote overeenkomsten vertoont met het mechanisme in de mens. In combinatie met het gevalideerde Q koorts infectiemodel kan naast de veiligheid ook een eerste indicatie gekregen worden van de effectiviteit van het AAC.
 - Het aantal dieren en het ongerief dat de dieren ondergaan is onvoldoende onderbouwd.
De onderzoeker heeft dit in de bijlagen beter onderbouwd.
 - In bijlage 2 wordt gesproken over preventieve behandeling. De DEC constateert dat de onderzoeker hier in de verdere aanvraag niet op terug komt en alleen de therapeutische behandeling uitwerkt. Verder vraagt de DEC zich af wat het nut is van preventieve behandeling. De DEC kan zich niet voorstellen dat men preventief antibiotica of antilichamen zal toedienen.
De term preventieve behandeling had hier niet moeten staan want dat is inderdaad geen voorstelbare toepassing van dit medicijn.

- De DEC is van mening dat de HEP's beter beschreven moeten worden. Kan er een scorelijst toegevoegd worden?
De klinische scorelijst is toegevoegd.
- De onderbouwing voor de keuze van het model (en daarmee het aantal dieren) moet verduidelijkt worden. Waarom is dit model het meest geschikt?
De keuze van het model is enerzijds gebaseerd op modellen waarin met succes muizen gebruikt worden voor veiligheids- en farmacokinetiekstudies van antilichamen die ontwikkeld worden voor gebruik in mensen. Anderzijds is het muizen Q-koorts model zoals beschreven in de aanvraag een Q-koorts infectie model met een korte looptijd en beperkt ongerief waarin de vraag of het AAC medicijn de doelcellen kan bereiken en de bacteriën af kan doden in cellen die zich buiten de bloedbaan in weefsel bevinden goed beantwoord kan worden.
- Verder wil de DEC weten of het gebruik van een wangprik kan leiden tot het verminderen van het aantal dieren omdat een dier dan vaker geprikt kan worden en gevolgd kan worden in de tijd.
Het is van belang om op orgaan / weefsel niveau te onderzoeken of er sprake is van bijwerkingen van het AAC medicijn. Aangezien het medicijn contact maakt met macrofagen die zich in weefsel bevinden kan dit leiden tot activatie van de cel. De betrokken cellen hebben hun natuurlijke functie in ontstekingsprocessen en activatie zou dus kunnen leiden tot een ontstekingsreactie in het orgaan. Dit zou een ongewenste bijwerking zijn. Door herhaalde bloedafname te introduceren zou de halfwaardetijd studie gesplitst worden van de bijwerkingen studie. Voor de bijwerkingen studie zouden dan apart nog muizen behandeld en opgeofferd moeten worden voor weefselonderzoek. Door de beide onderzoeken te combineren kunnen we juist minder muizen gebruiken. Het 5 x wekelijks achter elkaar via wangprik bloed afnemen veroorzaakt ook matig ongerief voor de muizen en vergt waarschijnlijk ook nog extra behandelingen en ongerief door de totale hoeveelheid afgenomen bloed per 2 weken dan mogelijk hoger uitkomt dan 10% van het circulerende volume op basis van 8 ml /kg lichaamsgewicht per 2 weken.
- Inherent aan het model is dat men enkel gebruik maakt van vrouwelijke dieren. Wanneer de onderzoeker goed kan onderbouwen dat dit model het meest geschikt is kan zij hiermee instemmen. De DEC wil echter wel weten of de resultaten verkregen bij vrouwelijke muizen in de toekomst te vertalen is naar mannelijke patiënten.
De keuze hiervoor wordt ingegeven doordat het Q koorts infectie model ontwikkeld en gevalideerd is met vrouwelijke muizen door een Frans zusterinstituut. Uit die studies blijkt dat de variatie tussen vrouwelijke dieren kleiner is dan bij mannelijke dieren en de infectie milder verloopt. Als wij op dit moment evenredig mannelijke en vrouwelijke muizen in zouden zetten zouden we eerst een voorstudie moeten doen om inzicht te krijgen in het verloop van de infectie bij mannelijke dieren en deze variant van het model valideren voordat de beoogde studies met de AAC kunnen plaats vinden. Als inderdaad blijkt dat er meer variatie is in het verloop van de infectie bij mannelijke dieren dan zal dit ook consequenties hebben voor de powerberekening en zal het uiteindelijk aantal dieren per groep in de effectiviteitsstudies toenemen. In totaal zal deze keuze dus zowel op kortere als waarschijnlijk ook op langere termijn leiden tot gebruik van meer dieren. Daarnaast is er geen essentieel verschil op basis van geslacht te verwachten voor wat betreft de uitkomsten rond de vraag of het AAC medicijn in staat is de bloedbaan te verlaten en cellen in weefsel te bereiken. Het toepassen van de onderzoeksvraag op zowel mannelijke als vrouwelijke muizen heeft in onze ogen dus geen toegevoegde waarde voor wat betreft mogelijkheden tot translatie.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

DATUM
9 mei 2017

ONS KENMERK
AVD401002017895

PAGINA
3 van 6

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel is op te splitsen in 3 delen:
 - De ontwikkeling van een antilichaam-antibioticum conjugaat tegen Q-koorts (AAC-Cb) in muizen
 - Het testen van AAC tegen Q koorts op veiligheid en farmacokinetiek in muizen
 - Het testen van therapeutische effectiviteit van AAC in muizenHet uiteindelijke doel is het ontwikkelen van AAC voor een effectieve behandeling van chronische en acute Q-koorts bij mensen.
5. De belanghebbenden in het project en hun morele waarden zijn:
 - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit
 - Patiënten: gezondheidsbelang
 - Onderzoeker/CRO: kennisvergaring en economisch belang
 - Maatschappij: gezondheidsbelang, het belang van het hebben van een effectief middel tegen Q-koorts, de algemene maatschappelijke bezorgdheid rond Q-koorts
 - De DEC merkt op dat er in deze fase van het project de farmaceutische industrie nog niet betrokken is bij het project
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op de aanvullende toelichting die de onderzoeker heeft gegeven en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn.
8. De DEC heeft, na aanvullende informatie van de onderzoeker beoordeeld te hebben, vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. De onderzoeker verwacht geen ongerief dat de classificatie matig overschrijdt. Wanneer dit door onvoorziene omstandigheden wel dreigt te gebeuren dan zorgen de HEP's ervoor dat het ongerief matig blijft. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: eenmalige ip-en-iv toediening
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier, anders dan voortvloeiend uit de proefhandelingen.
13. De DEC heeft, na beoordeling van de aanvullende informatie van de onderzoeker, vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn

gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. De DEC heeft gediscussieerd of vervanging mogelijk zou zijn door microdosering in de mens te gebruiken voor het bepalen van de dynamiek. Zij komt echter tot de conclusie dat deze techniek nog in de kinderschoenen staat en niet geschikt is om in te zetten in dit project.
15. De DEC heeft, na beoordeling van de door de onderzoeker verstrekte aanvullende informatie vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De onderzoeker heeft gekozen voor een model zonder klinische symptomen. Ook heeft de onderzoeker HEP's geformuleerd voor onvoorziene omstandigheden. De DEC ziet geen verdere mogelijkheden voor verfijning.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Inherent aan het model is dat men enkel gebruik maakt van vrouwelijke dieren. N.a.v. een vraag van de DEC heeft de onderzoeker goed onderbouwd dat dit model het meest geschikt is. De DEC kan hiermee instemmen.
19. De dieren worden gedood in het kader van het project. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

NTS

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is of onderzoek naar de veiligheid en werkzaamheid in muizen van een AAC tegen Q-koorts, opweegt tegen het naar verwachting lichte, maar maximaal matige, ongerief van 750 muizen.
2. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang.
Als het project zijn uiteindelijke doel behaalt dan acht de DEC de belangen voor de patiënten substantieel. Het gaat hierbij om de waarde van gezondheid: genezing van Q-koorts of de verlichting van de klachten. De DEC heeft in haar discussie meegenomen dat er twee groepen chronische Q-koorts patiënten te onderscheiden zijn: enerzijds de chronische Q-koorts waar 60% van de patiënten aan overlijdt en anderzijds de patiënten die chronische klachten houden na het doormaken van Q-koorts. Voor beide groepen kunnen resultaten van dit project relevant zijn. Gezien de maatschappelijke impact en onrust naar aanleiding van Q-koorts heeft de DEC ook de maatschappij als betrokkene in de afweging meegenomen. Het belang van de maatschappij, gerelateerd aan de waarden van volksgezondheid en een goede leefomgeving, ziet de DEC als een reëel belang. Gezien de samenwerking met de Nederlandse belangenorganisatie voor chronische Q-koorts patiënten en een ervaren universitair medisch centrum acht de DEC de kans dat het eindelijke doel ook gehaald kan worden als zeer reëel in. Zowel bij dit uiteindelijke doel als het directe doel hebben de onderzoekers een belang voor de onderzoeker. De DEC waardeert dat in dit project als een beperkt belang.
Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Het gaat om naar verwachting licht ongerief (en mogelijk matig ongerief indien de werkzaamheid van het vaccin niet voldoende blijkt te zijn). De integriteit van de proefdieren wordt in dit project niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.
3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar een therapie tegen Q-koorts met maximaal matig ongerief voor maximaal 750 dieren. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

DATUM

9 mei 2017

ONS KENMERK

AVD401002017895

PAGINA

5 van 6

DATUM

9 mei 2017

ONS KENMERK

AVD401002017895

PAGINA

6 van 6

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.

Met vriendelijke groet



**Form
Project proposal**

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research
1.3	Provide the title of the project.	Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input type="checkbox"/> Basic Research
		<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
		<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
		<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
		<input type="checkbox"/> 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.
-

De verwekker van Q-koorts, *C. burnetii* is een obligaet intracellulair pathogeen die zich met name verschuilt in macrofagen en macrofaag-achtige cellen in het lichaam. Blootstelling aan *Cb* kan leiden tot of acute of chronische infecties in mensen. Acute Q-koorts wordt in verband gebracht met lever en long-ontsteking. Chronische Q-koorts ontwikkelt zich over een periode van maanden tot jaren na de initiële infectie en wordt voornamelijk gekarakteriseerd door hartklepontsteking (endocarditis) of bloedvatontsteking (endovasculaire infectie). Hoewel slechts een klein percentage (2-5%) van de geïnfecteerde individuen chronische Q-koorts ontwikkelt, is de belasting van deze groep patiënten erg groot omdat langdurige behandeling met antibiotica nodig is om mortaliteit te voorkomen. Mortaliteit kan oplopen tot wel 60% wanneer chronische Q-koorts niet wordt behandeld. Naast de noodzaak van krachtigere antibiotica om acute Q-koorts te behandelen, zijn er vooral betere antibioticum behandelingen nodig voor chronische Q-koorts, één van de prioriteiten zoals vermeld in het rapport van de stichting Q-support.

De huidige antibiotica behandeling van Q-koorts patiënten die zijn geïnfecteerd met slechts één enkele pathogene bacterie – *C. burnetii* – toont vele overeenkomsten met chemotherapie ter behandeling van kanker: in beide gevallen wordt het hele lichaam bloot gesteld aan het medicijn, terwijl een relatief kleine populatie cellen (bacterie geïnfecteerde cellen/kanker cellen) het doel zijn. In het geval van kanker heeft de chemotherapie ernstige bijwerkingen voor de patiënt, in het geval van Q-koorts geeft de langdurige behandeling niet alleen bijwerkingen voor de patiënt, maar draagt het ook bij aan de problematische opkomst van antibiotica resistentie. Door continue blootstelling van de darmflora aan de antibiotica, ontstaan er antibiotica resistente bacteriën die bijdragen aan het als maar toenemende wereldwijde probleem van antibiotica resistentie. In beide gevallen zijn betere medicijnen, die specifiek de ziekte-veroorzakers aanpakken, wenselijk. Ons doel is om een eerste stap te zetten in de ontwikkeling van meer specifieke en krachtigere antibiotica ter behandeling van acute en vooral chronische Q-koorts.

Een aantal medicijnen die recentelijk zijn ontwikkeld ter behandeling van kanker hebben deze wenselijke eigenschappen. Antilichaam therapieën hebben de behandeling van kanker de laatste 20 jaar gerevolutioneerd. Deze antilichamen zijn ontwikkeld tot dragers van medicijnen om cytostatische medicijnen specifiek af te geven in tumoren. De antilichamen binden specifiek aan moleculen op de tumor cel en geven zo gericht de cytostatische medicijnen af waar ze werken moeten. Deze recent geïntroduceerde Antibody Drug Conjugates (ADC), Adcetris en Kadcyła, voor de

behandeling van respectievelijk Hodgkin lymphoma en HER2 positieve borstkanker zijn effectiever dan chemotherapie en hebben minder bijwerkingen. Recent is aangetoond dat conjugatie van antibiotica in plaats van cytostatische drugs aan antilichamen een veel belovende stap zou kunnen zijn voor de behandeling van multi-drug resistente Staphylococcus aureus (de ziekenhuis bacterie MRSA). (Lehar 2015) Door zijn obligate intracellulaire levensstijl is Cb een perfecte kandidaat voor een Antilichaam Antibiotica Conjugaten (AAC). Omdat het intracellulaire volume beperkt is, bereikt een relatief kleine hoeveelheid doelgerichte antibiotica snel voldoende concentratie in de cel om het pathogeen te elimineren. AAC kunnen krachtigere antibiotica naar de plaats van infectie brengen, om zowel op effectievere wijze de Q-koorts bacterie C. burnetii te elimineren als de ontwikkeling en verspreiding van antibioticum resistentie in de darmflora van de patiënt te voorkomen. De lange half-waarde tijd van antilichamen (30 dagen) in vergelijking met antibiotica (gemiddeld 3 uur) kan mogelijk leiden tot een verminderde doseringsfrequentie. Effectievere behandeling kan ook tot een kortere behandelingsduur van de Q-koorts patiënt leiden.

Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, DePalatis L, Raab H, Hazenbos WL, Morisaki JH, Kim J, Park S, Darwish M, Lee BC, Hernandez H, Loyet KM, Lupardus P, Fong R, Yan D, Chalouni C, Luis E, Khalfin Y, Plise E, Cheong J, Lyssikatos JP, Strandh M, Koefoed K, Andersen PS, Flygare JA, Wah Tan M, Brown EJ, Mariathasan S. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular S. aureus. Nature. 2015 Nov 19;527(7578):323-8. doi: 10.1038/nature16057.

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?

Dit onderzoeksvoorstel heeft één algemeen doel: Het ontwikkelen van Antilichaam Antibiotica Conjugaten (AAC) voor een effectieve behandeling van Q-koorts. Dit onderzoeksvoorstel hoort bij een project wat loopt bij een universitair research laboratorium waar de AAC ontwikkeld worden. Dit project is gehonoreerd door de Nederlandse belangen organisatie voor chronische Q-koorts patiënten. Deze organisatie is in hoge mate gericht op het subsidiëren van projecten die op kortere of langere termijn een bijdrage kunnen leveren aan de betere behandeling van chronische Q koorts patiënten en er is nauwlettend toezicht op dit project en de mogelijkheden tot translatie. Daarnaast heeft de onderzoeksgroep op basis van onderzoek tijdens de Q-koorts uitbraak in Nederland nauwe contacten met onder andere het universitair medisch centrum wat de zorg voor chronische Q-koorts patiënten uitvoert en coördineert. In de eerste fase van het project ligt de focus op het identificeren van het juiste antigeen en in vitro validatie. De geselecteerde AAC moeten veilig en effectief zijn tegen Cb in vivo. In de tweede fase van het project zullen deze resultaten daarom in vivo getest worden door het toepassen van de in vitro geteste AAC in het Q-koorts infectie muizen model. Door combinatie van bestaande expertise met betrekking tot de ontwikkeling van AAC, in vitro effectiviteit en kennis van en ervaring met het Q-koorts infectie model in muizen wordt de haalbaarheid van het project hoog geacht.

3.3 Relevance

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

Wetenschappelijk belang: ontwikkeling van AAC als mogelijke therapie tegen intra-cellulaire bacteriële infecties is een nieuwe ontwikkeling waarmee

antibiotica effectiever ingezet kunnen worden met minder bijwerkingen door lagere doseringen en doseringsfrequentie; en minder risico op resistentie ontwikkeling.

Voor dit specifieke in ontwikkeling zijnde medicijn is deze dierproefstudie de eerste stap van in vitro naar in vivo. Dit is een essentiële stap omdat in een in vitro systeem het medicijn en de cellen direct met elkaar in contact kunnen komen. In een dergelijk systeem werkt het medicijn in zowel dierlijke als humane cellen. In een in vivo situatie wordt het medicijn in de bloedbaan ingebracht en moet vervolgens de bloedbaan verlaten om bij de relevante cellen te komen die niet vrij in de bloedbaan bewegen maar in orgaanweefsel zitten. De huidige aanvraag is er dus op gericht om die vraag te beantwoorden en de muis is een goed model hiervoor omdat het mechanisme van verdeling van de AAC in de bloedbaan en de weefsel grote overeenkomsten vertoont met het mechanisme in de mens. Als de AAC inderdaad in de doelcellen in het weefsel aankomt en werkt tegen de bacterie zonder dat bijwerkingen optreden dan is dat een belangrijke set aan data die gebruikt kunnen worden in aanvragen die de opdrachtgever wil doen om toestemming te krijgen om het medicijn te gaan testen in 'clinical trials' met mensen. Varianten van deze combinatie medicijnen (een werkzame stof gekoppeld aan een antilichaammolecuul) zijn succesvol getest in muizenmodellen om vervolgens in te stromen in humane 'clinical trials' en de eerste varianten hiervan zijn recent op de markt gekomen. Maatschappelijk belang: Chronische Q-koorts is erg belastend voor patiënten omdat nu langdurige behandeling met antibiotica nodig is om mortaliteit te voorkomen. Mortaliteit kan oplopen tot wel 60% wanneer chronische Q-koorts niet wordt behandeld. Naast de noodzaak van krachtigere antibiotica om acute Q-koorts te behandelen, zijn er vooral betere antibioticum behandelingen nodig voor chronische Q-koorts, één van de prioriteiten zoals vermeld in het rapport van de stichting Q-support. Antibiotica Antilichaam Conjugaten (AAC) kunnen krachtigere antibiotica naar de plaats van infectie brengen, om zowel op effectievere wijze de Q-koorts bacterie *C. burnetii* te elimineren als de ontwikkeling en verspreiding van antibioticum resistentie in de darmflora van de patiënt te voorkomen. Mogelijk kunnen AAC ook leiden tot een verminderde doseringsfrequentie, en tot een kortere behandelingsduur van de Q-koorts patiënt.

3.4 Research Strategy

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

De eisen voor de ontwikkeling van Antibiotica Antilichaam Conjugaten die effectief antibiotica leveren op de plaats van infectie met *C. burnetii* viervoudig: het molecuul wat herkent wordt door het antilichaam moet op de (macrofaag)cellen voorkomen waar de bacterie zich in vermenigvuldigt, en dat molecuul moet in voldoende mate op de celmembraan aanwezig zijn om genoeg antibiotica af te leveren om *C. burnetii* effectief te doden. Het antilichaam moet specifiek en sterk binden aan het molecuul op de cel om correcte lokalisatie en afgifte van de antibiotica waarborgen. De koppeling die het antilichaam met het antibioticum verbindt moet zorgen voor afgifte van het antibiotica in de nabijheid van het pathogeen, maar tegelijkertijd moet het bescherming bieden tegen ongewenste afgifte in het plasma. Het antibioticum zelf moet voldoende sterk zijn om *C. burnetii* in lage concentraties te doden en actief zijn in een het relatief zure milieu van het fagosoom waar *C. burnetii* verblijft.

Fase 1 van het project is de ontwikkeling van AAC. Dit gedeelte van het project wordt uitgevoerd met behulp van chemische testen en in vitro cel systemen. AAC die in de in vitro systemen aan de bovenstaande eisen voldoen komen in aanmerking voor in vivo testen.

Fase 2 betreft het in vivo testen van geselecteerde AAC zoals beschreven in deze aanvraag.

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.

De in vivo testen richten zich op 2 hoofdonderdelen:

- (1) veiligheid en farmacokinetiek van de AAC: bepalen van een veilige en effectieve dosis en de halfwaardetijd van de AAC in vivo in de muis
- (2) therapeutische effectiviteit in het muis Q-koorts infectiemodel

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

Aan de hand van de in vitro resultaten is een inschatting gemaakt worden van welke dosis in vivo gebruikt moeten worden. Op basis hiervan moet in muizen bepaald worden of de berekende doses veilig zijn of leiden tot bijwerkingen.

In de veiligheidsstudie wordt voor elk te testen conjugaat eerst het antilichaam zonder antibioticum conjugaat getest worden. Als het antilichaam (zonder gekoppeld antibioticum) bijwerkingen laat zien ((acute) klinische verschijnselen en/of lokale ontstekingsverschijnselen in organen op basis van histopathologische analyse) dan zal dit antilichaam en de bijbehorende AAC niet verder getest worden. (Go / No Go)

Van de veilige antilichamen moet bepaald worden wat de halfwaardetijd van de AAC in vivo is in de muis zodat de dosis en het behandelingschema bepaald kunnen worden. Ook hier wordt naast farmacokinetische kenmerken ook de veiligheid van het AAC geëvalueerd. (Go / No Go)

Als de beoogde dosis veilig is voor de muis en zonder bijwerkingen gebruikt kan worden moet de effectiviteit van de AAC bepaald worden. Voor dit doel worden met muizen geïnfecteerd met Cb en vervolgens behandeld met AAC. In deze muizen wordt de effectiviteit van de behandeling bepaald aan de hand van de hoeveelheid Cb die in de milt van de muis aangetoond wordt na sectie.

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	Veiligheid en farmacokinetiek van AAC
2	Therapeutische effectiviteit van AAC

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	WR	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Veiligheid en farmacokinetiek van AAC

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.

Om te bepalen of het antilichaam-antibioticum conjugaat (AAC) veilig in vivo kan worden toegepast in hoeveelheden die nodig zijn om therapeutische effectiviteit te bereiken moeten veiligheids- en farmacokinetiek studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vindt een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Door de koppeling van de 2 actieve stoffen (antilichaam en antibioticum) is het mogelijk dat de farmacokinetiek (zoals de halfwaardetijd en de klaring) anders is dan van de afzonderlijke stoffen. Dit geldt ook voor mogelijke bijwerkingen. Om deze aspecten te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met verschillende doses van de ontwikkelde AAC.

Voor de veiligheids- en farmacokinetische studie is de primaire uitleesparameter de hoeveelheid AAC die in het bloed gemeten kan worden. Tussen het begin en het eind tijdstip moet een reductie van 82.5% met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95% gemeten worden. Op basis van de testeigenschappen levert dit een groepsgrootte per tijdstip op van 3 dieren. Op basis van gepubliceerde data voor de bepaling van antilichaam halfwaardetijd in muizen is een meetreeks van 5 tijdstippen noodzakelijk. Op 5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen.

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

Na 7 dagen acclimatisatie worden per te testen AAC 3 groepen vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd intraveneus geïnjecteerd met antilichaam of antilichaam-antibioticum conjugaat. Het antilichaam-antibioticum conjugaat wordt in 2 doses getest. Deze doses worden bepaald aan de hand van de berekende dosis op basis van gegevens van in vitro studies met cel systemen en een dosis die 10 maal hoger is. Het vrije antilichaam wordt in de hoge doses getest. Op 5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat.

Er is gekozen voor deze werkwijze omdat hiermee voorkomen wordt dat er bij de muizen herhaaldelijk (5 x in 28 dagen) voldoende bloed afgenomen moet worden voor de AAC bepalingen. Bij euthanasie kan ruim voldoende serum afgenomen worden en heeft deze methode als voordeel dat direct op weefselniveau eventuele bijwerkingen vastgesteld kunnen worden van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat. Aangezien de AAC methode zich specifiek richt op macrofagen en andere myeloïde cellen die met name in diverse weefsels voorkomen (en niet in circulatie) geniet deze benadering de voorkeur.

Eerst wordt bepaald of het antilichaam alleen een effect heeft, daarna de AAC. Om onnodig ongerief te voorkomen worden eerst de muizen behandeld voor het eind tijdstip (4 weken follow-up). Als in de eerste week na toediening geen klinische verschijnselen worden waargenomen wordt de eerstvolgende groep (3 weken follow-up) behandeld. Zo ook voor de groepen 2 weken follow-up, 1 week follow-up en 1 dag follow-up. Eén dag na de laatste toediening worden alle muizen geëuthanaseerd. Serum wordt gebruikt om de AAC halfwaardetijd te bepalen en de organen worden gebruikt om op weefselniveau steriele ontstekingsverschijnselen te analyseren.

Indien in de eerste week na toediening van het antilichaam alleen of de AAC een HEP toegepast moet worden, worden de volgende behandelingen niet gestart maar wordt eerst onderzocht of de HEP een gevolg is van de behandeling. Indien dit het geval is wordt de AAC niet verder onderzocht in de dierproef. (No Go)

Indien geen bijwerkingen optreden worden per antilichaam en AAC dosis 15 muizen gebruikt voor de veiligheids- en farmacokinetische studie (i.c. per dosis 3 muizen per groep x 5 tijdstippen).

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

Er is gekozen voor sequentieel opofferen van 3 dieren per tijdstip op 5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC op basis van bovenstaande redenering, statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over farmacokinetische studies van antilichamen in muizen (Tam 2013).

Voor de veiligheids- en farmacokinetische studie is de primaire uitleesparameter de hoeveelheid AAC die in het bloed gemeten kan worden. Tussen het begin en het eind tijdstip moet een reductie van 82.5% met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95% gemeten worden. Op basis van de testeigenschappen levert dit een groepsgrootte per tijdstip op van 3 dieren. Op basis van gepubliceerde data voor de bepaling van antilichaam halfwaardetijd in muizen is een meet reeks van 5 tijd punten noodzakelijk.

Tam SH, McCarthy SG, Brosnan K, Goldberg KM, Scallon BJ. Correlations between pharmacokinetics of IgG antibodies in primates vs. FcRn-transgenic mice reveal a rodent model with predictive capabilities. *MABs*. 2013 May-Jun;5(3):397-405. doi: 10.4161/mabs.23836.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor de Cb challenge en effectiviteitsstudies. Het gebruik van hetzelfde model met vrouwelijke dieren is belangrijk om de resultaten zo relevant mogelijk te maken voor de vervolgstudie (zie bijlage 2). Het opnieuw valideren van het muizen Cb infectie model is noodzakelijk als in dit stadium zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt gaan worden. Dit leidt tot een toename in aantal muizen. Aangezien de translocatie van antilichamen van bloed naar weefsel geen geslachtsgebonden kenmerk is is er geen noodzaak om deze aanpassing in het model te maken.

Voor 1 farmacokinetiek experiment worden maximaal 3 muizen per tijdstip op maximaal 5 tijdstippen gebruikt: 15 muizen (hiermee kan een tijdcurve gemaakt worden waaruit halfwaarde tijd berekend kan worden)

Voor elk te testen conjugaat zal eerst een proef met het antilichaam zonder antibioticum conjugaat uitgevoerd worden. Als het antilichaam zonder antibioticum bijwerkingen laat zien ((acute) klinische verschijnselen en/of lokale ontstekingsverschijnselen in organen op basis van histopathologische analyse dan zal dit antilichaam en de bijbehorende AAC niet verder getest worden. (No Go)

Voor elk AAC zijn 2 experimenten nodig om verschillende doses te testen voor kinetiek en mogelijke bijwerkingen (veiligheid).

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(15) \times (3) \times (5) = 225$ muizen gebruikt zullen worden.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
muis	licht	218	
muis	matig	7	

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.

Vervanging: farmacokinetiek en veiligheid kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening zodat alleen AAC kandidaten die specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven ook daadwerkelijk in dieren getest worden. Vermindering: in de methode gebruikt door Tam et al worden steeds 4 of 5 dieren per tijdstip bemonsterd. Echter de waargenomen spreiding in die data is zo beperkt dat wij in deze proef het aantal dieren per tijdstip terug gebracht hebben tot 3 dieren, hetgeen voldoende moet zijn voor een betrouwbaar resultaat. Door de volgorde van de proeven zo te kiezen dat bijwerkingen vroeg opgemerkt kunnen worden als een beperkt deel van de dieren gestart zijn met de behandeling kan het aantal dieren wat ingezet wordt bij een antilichaam of AAC met bijwerkingen sterk beperkt worden. Verfijning: wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde bloedafname uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels.

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

wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde retro-orbitale punctie uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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.

H. Pain and pain relief

De intraveneuze injectie met het antilichaam of de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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?

stress door hantering, bijwerking van het antilichaam of de AAC

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; de antilichaam component van het antilichaam of de AAC is gericht tegen moleculen op de oppervlakte van macrofagen en myeloïde cellen. Deze cellen kunnen ontstekingsverschijnselen veroorzaken als ze in weefsel geactiveerd worden. Bij in vivo toepassing van de AAC zou dit in de context van weefsel ontsteking tot gevolg kunnen hebben ook al is dit stimulerende effect in vitro bij cellijnen niet waargenomen.

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen opzet tot een minimum beperkt; door middel van in vitro vooronderzoek worden AAC ontwikkeld waarvan het onwaarschijnlijk is dat deze tot bijwerkingen zullen leiden; als bijwerkingen zoals ontsteking waargenomen worden is dit een no go voor verdere testen van het betreffende AAC.

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.

Het dagelijkse klinische scoresysteem ziet er als volgt uit: 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), minderactief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; de dieren met een score 3 worden twee maal daags gescoord, dieren die in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3 hebben worden geëuthanaseerd (HEP) 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 4 wordt de muis geëuthanaseerd (HEP) 5 = dood gevonden. HEP: het humaan eindpunt wordt gedefinieerd als 1x een score 4 of in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3. Muizen waar HEP op van toepassing is worden geëuthanaseerd en door middel van histopathologisch onderzoek geëvalueerd.

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

injectie met AAC: licht ongerief euthanasie: licht ongerief cumulatief ongerief indien geen bijwerking optreedt (>98% van de dieren): licht ongerief
Ongerief op basis van 1-malige intraveneuze injectie en euthanasie wordt ingeschat als licht. Indien bijwerkingen optreden die leiden tot toepassing van een HEP dan wordt het ongerief matig. Op basis van in vitro voorstudies wordt het risico op bijwerkingen als laag ingeschat omdat bij in vitro studies de antilichamen de cellen niet activeren (

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de antilichamen of AAC leidt tot ontstekingsverschijnselen in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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

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

Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	WR	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Therapeutische effectiviteit van AAC

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.

Om te bepalen of het antibioticum-antilichaam conjugaat (AAC) in vivo kan worden toegepast om therapeutische effectiviteit tegen *Coxiella burnetii* (Cb) te bereiken moeten therapeutische effectiviteits studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vind een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Om de therapeutische effectiviteit te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met de ontwikkelde AAC in de eerder bepaalde veilige optimale dosis. Hiervoor wordt een challenge model gebruikt waarbij muizen geïnfecteerd worden met Cb voor therapeutische behandeling met een AAC. Het challenge model dat in eerdere studies gebruikt is. Dit betreft een kort durend infectie model in muizen met een looptijd van 7 dagen waarbij muizen geen klinisch waarneembare symptomen hebben. Virulentie van Cb en ernst van infectie worden in dit model bepaald aan de hand van het gewicht van de muis, de milt van de muis en de Cb load in de milt.

Voor de effectiviteitsstudie is de primaire uitleesparameter de log₂ van de met qPCR bepaalde gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt zoals eerder beschreven door Kuley et al. 2015. Om op basis van gepubliceerde eigenschappen van het infectiemodel een daling van ten minste 40% in de gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt te kunnen meten (met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95%) als relevante maat voor effectiviteit van de AAC is een groepsgrootte 10 dieren per behandeling noodzakelijk.

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

Therapeutische effectiviteit: Na 7 dagen acclimatisatie worden vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd geïnfecteerd met ca 10⁵ genome copies Cb in max 0,2 ml volume via een intraperitoneale injectie. Op 18-24 uur na infectie worden de muizen intraveneus geïnjecteerd met de vooraf bepaalde dosis AAC in max. 0.2 ml volume (bijlage 1). Afhankelijk van de farmacokinetiek zoals bepaald in bijlage 1 wordt de behandeling met AAC in de periode van 2-6 dagen na infectie maximaal 2 maal herhaald. Controle groepen (3) krijgen een intraveneuze behandeling met fysiologische zoutoplossing (1), antilichaam zonder antibioticum (2) en vrij antibioticum (3). Zeven dagen na infectie worden de muizen geëuthanaseerd. De muizen worden gewogen, de milt wordt verwijderd en gewogen en de load van Cb in de milt wordt bepaald als maat voor effectiviteit van de AAC.

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

Er is gekozen voor een eindpunt studie op basis van bovenstaande redenering en statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over therapeutisch effect van AAC tegen *Staphylococcus aureus* infectie in een vergelijkbaar muizen model (Lehar 2015) en het infectiemodel van Cb in Swiss OF1 muizen [REDACTED]

Voor de effectiviteitsstudie is de primaire uitleesparameter de log₂ van de met qPCR bepaalde gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt zoals eerder beschreven door Kuley et al. 2015. Om op basis van gepubliceerde eigenschappen van het infectiemodel een daling van ten minste 40% in de gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt te kunnen meten (met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95%) als relevante maat voor effectiviteit van de AAC is een groepsgrootte 10 dieren per behandeling noodzakelijk.

Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, DePalatis L, Raab H, Hazenbos WL, Morisaki JH, Kim J, Park S, Darwish M, Lee BC, Hernandez H, Loyet KM, Lupardus P, Fong R, Yan D, Chalouni C, Luis E, Khalfin Y, Plise E, Cheong J, Lyssikatos JP, Strandh M, Koefoed K, Andersen PS, Flygare JA, Wah Tan M, Brown EJ, Mariathasan S. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*. 2015 Nov 19;527(7578):323-8. doi: 10.1038/nature16057.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor eerder beschreven Cb challenge model en de voorafgaande farmacokinetiek studie (zie bijlage 1). Het gebruik van hetzelfde model is belangrijk om de resultaten zo betrouwbaar mogelijk te maken en vergelijkbaar met eerder onderzoek voor wat betreft het Cb challenge model.

Voor 1 effectiviteitsexperiment worden maximaal 10 muizen per challenge groep gebruikt en 4 groepen: controle (behandeld met fysiologisch zout oplossing); alleen 1 malig antilichaam; alleen 1 malig antibioticum en 1 malig AAC. = totaal 40 dieren

De effectiviteit van de AAC wordt getest tegen de referentiestam NineMile, en 2 gekarakteriseerde veldisolaten (geit en rund). De geitenstam die getest wordt betreft de stam van de Nederlandse Q-koorts uitbraak en is dus zeer relevant voor de verdere translatie van de AAC naar een medicijn voor de chronische Q koorts patienten.

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(40) \cdot (3) \cdot (5) = 600$ muizen gebruikt zullen worden.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
muis	matig	600	

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.

Vervanging: effectiviteit kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening en een in vivo veiligheidsstudie (zie bijlage 1) zodat alleen AAC kandidaten die zonder bijwerkingen specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven en Cb afdoden ook daadwerkelijk in Cb geïnfecteerde dieren getest worden. Vermindering: op basis van behaalde resultaten in technisch vergelijkbare studies wordt het minimaal aantal dieren gebruikt waarbij een betrouwbaar resultaat te behalen is. Verfijning: het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden.

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

Het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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.

De ip injectie met het infectie inoculum en de iv injectie met de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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?

stress door hantering, infectie met Cb

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; intra peritoneale injectie met virulente Cb kan mogelijk in uitzonderlijke gevallen tot ontsteking van de buikholte leiden

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen methode tot een minimum beperkt, er wordt een muizen model gebruikt waar het ontstaan van klinische symptomen uitzonderlijk is, door toepassing van humane eindpunten wordt ernstig ongerief voorkomen

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.

Het dagelijkse klinische scoresysteem ziet er als volgt uit: 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), minder actief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; de dieren met een score 3 worden twee maal daags gescoord, dieren die in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3 hebben worden geëuthanaseerd (HEP) 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 4 wordt de muis geëuthanaseerd (HEP) 5 = dood gevonden. HEP: het humaan eindpunt wordt gedefinieerd als 1x een score 4 of in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3.

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

Het ongerief is gelijk voor alle dieren: injectie met fysiologisch zout, antilichaam, antibioticum of AAC: licht ongerief injectie met Cb: licht ongerief infectie met Cb: licht ongerief euthanasie: licht ongerief Het cumulatief ongerief van de diverse handelingen in het beperkte tijdspad van 7 dagen wordt ingeschat als matig ongerief

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de AAC leidt tot therapeutisch effectieve afdoding van Cb in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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

Van: DEC WUR <dec@wur.nl>
Verzonden: maandag 29 mei 2017 9:42
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
Onderwerp: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD401002017895

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Dit aantal komt door de verwarring die er geweest is in het DEC-traject over het aantal dieren. Onderstaand een citaat uit een mail van de onderzoeker aan de DEC:

“In de bijlagen een word document met de antwoorden op onderstaande vragen en de pdf van de aangepaste aanvraag. Na de beoordeling door de IvD is het totaal aantal dieren naar beneden bijgesteld in verband met een vermeende telfout. Tijdens het aanpassen van de aanvraag nav de vragen van de DEC kwam ik er echter achter dat dit niet terecht was en heb dit bijgesteld naar het originele aantal. Dit laatste ter toelichting waarom het aantal dieren in de aanvraag gewijzigd is. “

In het DEC-advies heb ik per abuis het verkeerde aantal opgenomen. De DEC heeft de aangepaste versie met het juiste aantal dieren beoordeeld en daarop haar ethische afweging gebaseerd

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van de [REDACTED] is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

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

Sent: woensdag 24 mei 2017 17:37

To: DEC WUR

Subject: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD401002017895

Geachte DEC-WUR,

Op 10-03-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts' met aanvraagnummer AVD401002017895.

In uw ethische afweging (D1) geeft u aan dat er sprake is van 750 muizen. In de aanvraag die wij hebben ontvangen, gaat het echter om 825 dieren. Kunt u aangeven of uw ethische afweging gelijk is met meer dieren?

Kunt u hier voor 1 juni 2017 antwoord op geven?

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

Met vriendelijke groet,


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

Stichting Wageningen Research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**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
AVD401002017895

Datum 24 mei 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ████████,

Op 10 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" met aanvraagnummer AVD401002017895. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

Kunt u voor beide Bijlage Dierproeven aangeven wat de kans is dat dieren de criteria van humane eindpunten halen? Kunt u dit verwerken in een nieuwe Bijlage Dierproeven?

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Datum:

24 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002017895

Appendix

Description animal procedures

14.

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority' | 40100

1.2 Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Wageningen Research

1.3 List the different types of animal procedures.
Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

Serial number	Type of animal procedure
1	Veiligheid en farmacokinetiek van AAC

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.

Om te bepalen of het antilichaam-antibioticum conjugaat (AAC) veilig in vivo kan worden toegepast in hoeveelheden die nodig zijn om therapeutische effectiviteit te bereiken moeten veiligheids- en farmacokinetiek studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vindt een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Door de koppeling van de 2 actieve stoffen (antilichaam en antibioticum) is het mogelijk dat de farmacokinetiek (zoals de halfwaardetijd en de klaring) anders is dan van de afzonderlijke stoffen. Dit geldt ook voor mogelijke bijwerkingen. Om deze aspecten te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met verschillende doses van de ontwikkelde AAC.

Voor de veiligheids- en farmacokinetische studie is de primaire uitleesparameter de hoeveelheid AAC die in het bloed gemeten kan worden. Tussen het begin en het eind tijdstip moet een reductie van 82.5% met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95% gemeten worden. Op basis van de testeigenschappen levert dit een groepsgrootte per tijdstip op van 3 dieren. Op basis van gepubliceerde data voor de bepaling van antilichaam halfwaardetijd in muizen is een meetreeks van 5 tijdstipen noodzakelijk. Op 5 tijdstipen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen.

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

Na 7 dagen acclimatisatie worden per te testen AAC 3 groepen vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd intraveneus geïnjecteerd met antilichaam of antilichaam-antibioticum conjugaat. Het antilichaam-antibioticum conjugaat wordt in 2 doses getest. Deze doses worden bepaald aan de hand van de berekende dosis op basis van gegevens van in vitro studies met cel systemen en een dosis die 10 maal hoger is. Het vrije antilichaam wordt in de hoge doses getest. Op 5 tijdstipen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC worden 3 dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Serum van deze muizen wordt gebruikt om de farmacokinetiek van de AAC te bepalen en diverse weefsels van deze dieren wordt geanalyseerd door middel van macroscopisch en histopathologisch onderzoek om, naast klinische observatie, bijwerkingen vast te kunnen stellen van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat.

Er is gekozen voor deze werkwijze omdat hiermee voorkomen wordt dat er bij de muizen herhaaldelijk (5 x in 28 dagen) voldoende bloed afgenomen moet worden voor de AAC bepalingen. Bij euthanasie kan ruim voldoende serum afgenomen worden en heeft deze methode als voordeel dat direct op weefselniveau eventuele bijwerkingen vastgesteld kunnen worden van zowel het vrije antilichaam als het antilichaam-antibioticum conjugaat. Aangezien de AAC methode zich specifiek richt op macrofagen en andere myeloïde cellen die met name in diverse weefsels voorkomen (en niet in circulatie) geniet deze benadering de voorkeur.

Eerst wordt bepaald of het antilichaam alleen een effect heeft, daarna de AAC. Om onnodig ongerief te voorkomen worden eerst de muizen behandeld voor het eind tijdstip (4 weken follow-up). Als in de eerste week na toediening geen klinische verschijnselen worden waargenomen wordt de eerstvolgende groep (3 weken follow-up) behandeld. Zo ook voor de groepen 2 weken follow-up, 1 week follow-up en 1 dag follow-up. Eén dag na de laatste toediening worden alle muizen geëuthanaseerd. Serum wordt gebruikt om de AAC halfwaardetijd te bepalen en de organen worden gebruikt om op weefselniveau steriele ontstekingsverschijnselen te analyseren.

Indien in de eerste week na toediening van het antilichaam alleen of de AAC een HEP toegepast moet worden, worden de volgende behandelingen niet gestart maar wordt eerst onderzocht of de HEP een gevolg is van de behandeling. Indien dit het geval is wordt de AAC niet verder onderzocht in de dierproef. (No Go)

Indien geen bijwerkingen optreden worden per antilichaam en AAC dosis 15 muizen gebruikt voor de veiligheids- en farmacokinetische studie (i.c. per dosis 3 muizen per groep x 5 tijdstippen).

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

Er is gekozen voor sequentieel opofferen van 3 dieren per tijdstip op 5 tijdstippen in een periode tot maximaal 28 dagen na toediening van de AAC op basis van bovenstaande redenering, statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over farmacokinetische studies van antilichamen in muizen (Tam 2013).

Voor de veiligheids- en farmacokinetische studie is de primaire uitleesparameter de hoeveelheid AAC die in het bloed gemeten kan worden. Tussen het begin en het eind tijdstip moet een reductie van 82.5% met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95% gemeten worden. Op basis van de testeigenschappen levert dit een groeps grootte per tijdstip op van 3 dieren. Op basis van gepubliceerde data voor de bepaling van antilichaam halfwaardetijd in muizen is een meet reeks van 5 tijd punten noodzakelijk.

Tam SH, McCarthy SG, Brosnan K, Goldberg KM, Scallon BJ. Correlations between pharmacokinetics of IgG antibodies in primates vs. FcRn-transgenic mice reveal a rodent model with predictive capabilities. *MAbs*. 2013 May-Jun;5(3):397-405. doi: 10.4161/mabs.23836.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor de Cb challenge en effectiviteitsstudies. Het gebruik van hetzelfde model met vrouwelijke dieren is belangrijk om de resultaten zo relevant mogelijk te maken voor de vervolgstudie (zie bijlage 2). Het opnieuw valideren van het muizen Cb infectie model is noodzakelijk als in dit stadium zowel mannelijke als

vrouwelijke dieren gebruikt gaan worden. Dit leidt tot een toename in aantal muizen. Aangezien de translocatie van antilichamen van bloed naar weefsel geen geslachtsgebonden kenmerk is is er geen noodzaak om deze aanpassing in het model te maken.

Voor 1 farmacokinetiek experiment worden maximaal 3 muizen per tijdstip op maximaal 5 tijdstippen gebruikt: 15 muizen (hiermee kan een tijdcurve gemaakt worden waaruit halfwaarde tijd berekend kan worden)

Voor elk te testen conjugaat zal eerst een proef met het antilichaam zonder antibioticum conjugaat uitgevoerd worden. Als het antilichaam zonder antibioticum bijwerkingen laat zien ((acute) klinische verschijnselen en/of lokale ontstekingsverschijnselen in organen op basis van histopathologische analyse dan zal dit antilichaam en de bijbehorende AAC niet verder getest worden. (No Go)

Voor elk AAC zijn 2 experimenten nodig om verschillende doses te testen voor kinetiek en mogelijke bijwerkingen (veiligheid).

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(15) \cdot (3) \cdot (5) = 225$ muizen gebruikt zullen worden.

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.

Vervanging: farmacokinetiek en veiligheid kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening zodat alleen AAC kandidaten die specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven ook daadwerkelijk in dieren getest worden

Vermindering: in de methode gebruikt door Tam et al worden steeds 4 of 5 dieren per tijdstip bemonsterd. Echter de waargenomen spreiding in die data is zo beperkt dat wij in deze proef het aantal dieren per tijdstip terug gebracht hebben tot 3 dieren, hetgeen voldoende moet zijn voor een betrouwbaar resultaat. Door de volgorde van de proeven zo te kiezen dat bijwerkingen vroeg opgemerkt kunnen worden als een beperkt deel van de dieren gestart zijn met de behandeling kan het aantal dieren wat ingezet wordt bij een antilichaam of AAC met bijwerkingen sterk beperkt worden. Verfijning: wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde bloedafname uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels.

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

wij kiezen ervoor om voor de farmacokinetiek niet herhaalde retro-orbitale punctie uit te voeren bij de muizen als methode om serum te verzamelen maar onderzoek naar bijwerkingen op weefsel niveau te combineren met de farmacokinetiek studie. Hierbij worden dieren per tijdstip geëuthanaseerd. Het ongerief voor de dieren is hierdoor minder, er kan meer serum afgenomen worden wat de betrouwbaarheid van de AAC bepalingstesten ten goede komt en er kan nauwkeurig onderzoek gedaan worden naar bijwerkingen in relevante weefsels. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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.

De intraveneuze injectie met het antilichaam of de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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?

stress door hantering, bijwerking van het antilichaam of de AAC

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; de antilichaam component van het antilichaam of de AAC is gericht tegen moleculen op de oppervlakte van macrofagen en myeloïde cellen. Deze cellen kunnen ontstekingsverschijnselen veroorzaken als ze in weefsel geactiveerd worden. Bij in vivo toepassing van de AAC zou dit in de context van weefsel ontsteking tot gevolg kunnen hebben ook al is dit stimulerende effect in vitro bij cellijnen niet waargenomen.

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen opzet tot een minimum beperkt; door middel van in vitro vooronderzoek worden AAC ontwikkeld waarvan het onwaarschijnlijk is dat deze tot bijwerkingen zullen leiden; als bijwerkingen zoals ontsteking waargenomen worden is dit een no go voor verdere testen van het betreffende AAC.

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.

Het dagelijkse klinische scoresysteem ziet er als volgt uit: 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), minder actief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; de dieren met een score 3 worden twee maal daags gescoord, dieren die in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3 hebben worden geëuthanaseerd (HEP) 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 4 wordt de muis geëuthanaseerd (HEP) 5 = dood gevonden. HEP: het humaan eindpunt wordt gedefinieerd als 1x een score 4 of in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3. Muizen waar HEP op van toepassing is worden geëuthanaseerd en door middel van histopathologisch onderzoek geëvalueerd.

Indicate the likely incidence.

<2%

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).

injectie met AAC: licht ongerief euthanasie: licht ongerief cumulatief ongerief indien geen bijwerking optreedt (>98% van de dieren): licht ongerief Ongerief op basis van 1-malige intraveneuze injectie en euthanasie wordt ingeschat als licht. Indien bijwerkingen optreden die leiden tot toepassing van een HEP dan wordt het ongerief matig. Op basis van in vitro voorstudies wordt het risico op bijwerkingen als laag ingeschat omdat bij in vitro studies de antilichamen de cellen niet activeren (

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de antilichamen of AAC leidt tot ontstekingsverschijnselen in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority' 40100

1.2 Provide the name of the licenced establishment. Stichting Wageningen Research

1.3 List the different types of animal procedures.

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

Serial number	Type of animal procedure
2	Therapeutische effectiviteit van AAC

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.

Om te bepalen of het antibioticum-antilichaam conjugaat (AAC) in vivo kan worden toegepast om therapeutische effectiviteit tegen *Coxiella burnetii* (Cb) te bereiken moeten therapeutische effectiviteits studies verricht worden. Iedere AAC bestaat uit een combinatie van een specifiek antilichaam en een antibioticum. Het antilichaam is in staat om aan macrofagen en andere relevante myeloïde cellen te binden waar *Coxiella burnetii* (Cb) zich in kan ophouden en zorgt er dus voor dat het antibioticum op de juiste plaats in het lichaam wordt afgeleverd. Na binding van het antilichaam wordt de AAC in zijn geheel opgenomen door de fagocyterende cel. In de cel vindt een enzymatische splitsing plaats waardoor het antibioticum los komt van de AAC en de bacterie in de cel kan doden. Om de therapeutische effectiviteit te kwantificeren en evalueren worden dieren behandeld met de ontwikkelde AAC in de eerder bepaalde veilige optimale dosis. Hiervoor wordt een challenge model gebruikt waarbij muizen geïnfecteerd worden met Cb voor therapeutische behandeling met een AAC. Het challenge model dat in eerdere studies gebruikt is. Dit betreft een kort durend infectie model in muizen met een looptijd van 7 dagen waarbij muizen geen klinisch waarneembare symptomen hebben. Virulentie van Cb en ernst van infectie worden in dit model bepaald aan de hand van het gewicht van de muis, de milt van de muis en de Cb load in de milt.

Voor de effectiviteitsstudie is de primaire uitleesparameter de log₂ van de met qPCR bepaalde gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt zoals eerder beschreven door ██████████. Om op basis van gepubliceerde eigenschappen van het infectiemodel een daling van ten minste 40% in de gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt te kunnen meten (met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95%) als relevante maat voor effectiviteit van de AAC is een groepsgrootte 10 dieren per behandeling noodzakelijk.

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

Therapeutische effectiviteit: Na 7 dagen acclimatisatie worden vrouwelijke muizen van 6-8 weken leeftijd geïnfecteerd met ca 10⁵ genome copies Cb in max 0,2 ml volume via een intraperitoneale injectie. Op 18-24 uur na infectie worden de muizen intraveneus geïnjecteerd met de vooraf bepaalde dosis AAC in max. 0.2 ml volume (bijlage 1). Afhankelijk van de farmacokinetiek zoals bepaald in bijlage 1 wordt de behandeling met AAC in de periode van 2-6 dagen na infectie maximaal 2 maal herhaald. Controle groepen (3) krijgen een intraveneuze behandeling met fysiologische zoutoplossing (1), antilichaam zonder antibioticum (2) en vrij antibioticum (3). Zeven dagen na infectie worden de muizen geëuthanaseerd. De muizen worden gewogen, de milt wordt verwijderd en gewogen en de load van Cb in de milt wordt bepaald als maat voor effectiviteit van de AAC.

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

Er is gekozen voor een eindpunt studie op basis van bovenstaande redenering en statistische methoden en uitkomst gegevens in de literatuur over therapeutisch effect van AAC tegen *Staphylococcus aureus* infectie in een vergelijkbaar muizen model (Lehar 2015) en het infectiemodel van Cb in Swiss OF1 muizen (Kuley 2015).

Voor de effectiviteitsstudie is de primaire uitleesparameter de log₂ van de met qPCR bepaalde gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt zoals eerder beschreven door Kuley et al. 2015. Om op basis van gepubliceerde eigenschappen van het infectiemodel een daling van ten minste 40% in de gemiddelde bacteriële 'genome copy number' per gram milt te kunnen meten (met een power van 80% en een betrouwbaarheid van 95%) als relevante maat voor effectiviteit van de AAC is een groepsgrootte 10 dieren per behandeling noodzakelijk.

Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, DePalatis L, Raab H, Hazenbos WL, Morisaki JH, Kim J, Park S, Darwish M, Lee BC, Hernandez H, Loyet KM, Lupardus P, Fong R, Yan D, Chalouni C, Luis E, Khalfin Y, Plise E, Cheong J, Lyssikatos JP, Strandh M, Koefoed K, Andersen PS, Flygare JA, Wah Tan M, Brown EJ, Mariathan S. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*. 2015 Nov 19;527(7578):323-8. doi: 10.1038/nature16057.

B. The animals

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

De studies worden uitgevoerd met 6-8 weken oude vrouwelijke muizen (Specific Pathogen Free female Swiss OF1 stam) van erkend fokbedrijf. Dit is de muizenstam, geslacht en leeftijd zoals die ook gebruikt wordt voor eerder beschreven Cb challenge model en de voorafgaande farmacokinetiek studie (zie bijlage 1). Het gebruik van hetzelfde model is belangrijk om de resultaten zo betrouwbaar mogelijk te maken en vergelijkbaar met eerder onderzoek voor wat betreft het Cb challenge model.

Voor 1 effectiviteitsexperiment worden maximaal 10 muizen per challenge groep gebruikt en 4 groepen: controle (behandeld met fysiologisch zout oplossing); alleen 1 malig antilichaam; alleen 1 malig antibioticum en 1 malig AAC. = totaal 40 dieren

De effectiviteit van de AAC wordt getest tegen de referentiestam NineMile, en 2 gekarakteriseerde veldisolaten (geit en rund). De geitenstam die getest wordt betreft de stam van de Nederlandse Q-koorts uitbraak en is dus zeer relevant voor de verdere translatie van de AAC naar een medicijn voor de chronische Q koorts patienten.

In totaal zullen maximaal 5 AAC worden ontwikkeld die gericht zijn tegen verschillende moleculen die op de oppervlakte van macrofagen aanwezig zijn. Aan deze antilichamen wordt een antibioticum gekoppeld dat werkzaam is tegen Cb (bijvoorbeeld rifamycine of derivaten daarvan).

Dat betekent dat maximaal $(40) \cdot (3) \cdot (5) = 600$ muizen gebruikt zullen worden.

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.

Vervanging: effectiviteit kan alleen uitgevoerd worden in het levende dier. Te testen AAC kandidaten gaat door een uitgebreide in vitro voorscreening en een in vivo veiligheidsstudie (zie bijlage 1) zodat alleen AAC kandidaten die zonder bijwerkingen specifiek de beoogde doelcellen herkennen en op de juiste wijze het antibioticum in de cel afgeven en Cb afdoden ook daadwerkelijk in Cb geïnfecteerde dieren getest worden. Vermindering: op basis van behaalde resultaten in technisch vergelijkbare studies wordt het minimaal aantal dieren gebruikt waarbij een betrouwbaar resultaat te behalen is. Verfijning: het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden.

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

Het gekozen muizen model leidt niet tot klinische symptomen bij de muizen in tegenstelling tot andere Cb infectiemodellen terwijl op basis van milt gewicht en Cb load in de milt een goede indicatie van effectiviteit gemeten kan worden. Dieren worden gehouden in groepen en kooiverrijking wordt toegepast.

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.

De AAC tegen Cb die ontwikkeld worden zijn voor zover ons bekend uniek en niet eerder beschreven

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.

De ip injectie met het infectie inoculum en de iv injectie met de AAC zal vanwege het doorsteken van de huid een korte lichte pijnprikkel geven maar het ongerief door het toepassen van een pijnbestrijdingsmethode weegt niet op tegen het te verwachten effect hiervan.

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?

stress door hantering, infectie met Cb

Explain why these effects may emerge.

oppakken en behandelen van dieren is stressvol; intra peritoneale injectie met virulente Cb kan mogelijk in uitzonderlijke gevallen tot ontsteking van de buikholte leiden

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

het aantal handelingen per dier is door de gekozen methode tot een minimum beperkt, er wordt een muizen model gebruikt waar het ontstaan van klinische symptomen uitzonderlijk is, door toepassing van humane eindpunten wordt ernstig ongerief voorkomen

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.

Het dagelijkse klinische scoresysteem ziet er als volgt uit: 0 = normale muis; 1 = ruwe vacht, maar net zo actief tijdens handelingen als normale muis; 2 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), minderactief tijdens handelingen; 3 = ruwe vacht, (bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, minder actief tijdens handelingen; de dieren met een score 3 worden twee maal daags gescoord, dieren die in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3 hebben worden geëuthanaseerd (HEP) 4 = ruwe vacht, (evt. bol/opgerold), moeilijkere (versnelde, buik-) ademhaling, geringe reactie als de muis wordt opgepakt of gemanipuleerd. Bij score 4 wordt de muis geëuthanaseerd (HEP) 5 = dood gevonden. HEP: het humaan eindpunt wordt gedefinieerd als 1x een score 4 of in een periode van 24 uur op drie opeenvolgende waarnemingen een score 3.

Indicate the likely incidence.

<2%

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).

Het ongerief is gelijk voor alle dieren: injectie met fysiologisch zout, antilichaam, antibioticum of AAC: licht ongerief injectie met Cb: licht ongerief infectie met Cb: licht ongerief euthanasie: licht ongerief Het cumulatief ongerief van de diverse handelingen in het beperkte tijdspad van 7 dagen wordt ingeschat als matig ongerief

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Om te bepalen of de toepassing van de AAC leidt tot therapeutisch effectieve afdoding van Cb in weefsels is het doden van het dier essentieel.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



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

AVD401002017895

Bijlagen

1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 10 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" met aanvraagnummer AVD401002017895. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 31 mei 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof het percentage van de dieren die de criteria van humane eindpunten zullen halen.

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.

U kunt met uw project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juli 2017 tot en met 1 juni 2019.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC-WUR. Dit advies is opgesteld op 9 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 29 mei 2017 heeft de DEC

gereageerd op onze vragen. Dit betrof het aantal dieren waarop de ethische afweging is gebaseerd.

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.

Datum:
6 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017895

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
namens deze:



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: Stichting Wageningen Research
Adres: Postbus 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juli 2017 tot en met 1 juni 2019, voor het project "Antilichaam-antibioticum conjugaat therapie tegen Q-koorts" met aanvraagnummer AVD401002017895, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-WUR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is .

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 mei 2017, ontvangen op 9 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 31 mei 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Veiligheid en farmacokinetiek van AAC				
	Muizen (Mus musculus) / Swiss OF1	225	3% Matig 97% Licht	
3.4.4.2 Therapeutische effectiviteit van AAC				
	Muizen (Mus musculus) / Swiss OF1	600	Matig	

Voorwaarden

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

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

Aanvraagnummer:
AVD401002017895

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.



Aanvraagnummer:

AVD401002017895

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

Aanvraagnummer:

AVD401002017895

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

Einde van een dierproef

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

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

Uit artikel 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.