

|                    |             |                    |                  |
|--------------------|-------------|--------------------|------------------|
| Proefopzet         | [REDACTED]  | Auteur:            | [REDACTED]       |
| Creatie:           | 28-11-2013  | Laatste wijziging: | 14-01-2014       |
| Status proefopzet: | Geannuleerd | Status experiment: | Nog niet gestart |

**ALGEMEEN****Project**

Projectnummer: [REDACTED]  
Project titel: RSV  
Projectleider(s): [REDACTED]  
Startdatum project: 01-01-2013

**Dierproef**

Titel dierproef: Alternatieve toediening van RSV-kandidaat vaccin  
Aard van de dierproef: 2-Onderdeel van een lopend project  
Dierproef behoort tot het onderzoek van het: IntraVacc  
Lab/Unit/Afd: Intravacc  
Geplande inzetdatum: 03-02-2014

Diernummers: 1-168  
Duur dierproef: 1-2 jaar  
Doorlooptijd proefopzet: 1 jaar of minder  
Art. 9  
Art. 9 Vervanger: [REDACTED]  
Art. 12: [REDACTED]  
Medewerkers: [REDACTED]  
Tijdschrijven op: [REDACTED]

**VRAAGSTELLING****Project****Geef een beknopte samenvatting van de achtergrond van het project.**

Respiratoir syncytieel Virus (RSV) is de meest voorkomende oorzaak van virale lage luchtweginfecties in kinderen, met name in pasgeborenen. Ook bij ouderen veroorzaakt RSV met grote regelmaat ernstige longontsteking, die leidt tot ziekenhuisopname en soms zelf dodelijk kan zijn ([REDACTED]). Tot op heden is er geen veilig en effectief vaccin beschikbaar.

In het RIVM rapport 'The national immunization programme in the Netherlands' (210021002/2005) wordt aanbevolen een vaccin tegen RSV, zodra dit beschikbaar is, op te nemen in het rijksvaccinatieprogramma (RVP). Binnen [REDACTED] wordt er gewerkt aan de ontwikkeling van een vaccin dat bescherming biedt tegen RSV-infectie, zowel bij zeer jonge kinderen als bij ouderen.

[REDACTED] en ook in oudere katoenratten lichte mate van bescherming induceert [REDACTED]. Op basis van de behaalde resultaten met het [REDACTED], is besloten met dit vaccin als prototype vaccin door te gaan voor de verdere ontwikkeling.

Het uiteindelijke doel van dit project is om een vaccin te maken dat immunologische bescherming induceert tegen RSV infectie. De vaccin kandidaten die wij testen zijn gebaseerd op verzwakte levende RSV-virussen. De gebruikelijke toedieningsroute van een potentieel RSV-vaccin is intranasaal. Deze route is gekozen omdat die het mucosale immuunsysteem activeert, wat de natuurlijke weg is voor bescherming tegen respiratoire pathogenen als RSV. Echter heeft intranasale toediening van een vaccin bij pasgeboren baby's nadelen, zoals de kans op benauwdheid en tijdelijke bijwerkingen doordat het virus in het vaccin in de zenuwbanen vlak achter de neus terecht zou kunnen komen. Met name de kans op benauwdheid na intranasale vaccinatie van baby's die nog borstvoeding krijgen en het risico dat een dergelijke benauwdheid aanleiding kan geven tot het melden van vaccin gerelateerde complicaties, is voor de farmaceutische industrie reden geïnteresseerd te zijn in alternatieven voor intranasale vaccinatie.

**Welke concrete vraag / vragen wilt u met dit project beantwoorden?**

Is het mogelijk een vaccin te ontwikkelen tegen respiratoir syncytieel virus (RSV) dat geschikt is voor toepassing bij zeer jonge kinderen (neonaten) en opgenomen kan worden in het rijksvaccinatieprogramma?

**Wat is het maatschappelijk belang van het project?**

RSV is de meest voorkomende ziekteverwekker bij jonge kinderen die met een acute luchtweginfectie opgenomen moeten worden in het ziekenhuis. Afhankelijk van de effectiviteit kan een RSV vaccin een aanzienlijk deel van deze genoemde ziekenhuisopnamen en sterfte voorkomen. Binnen de WHO wordt de ontwikkeling van een vaccin tegen RSV gezien als een belangrijke speerpunt i.v.m. wereldwijde ziektelast.

**Wat is het wetenschappelijk belang van het project?**

Onderzoeken of het [REDACTED] RSV [REDACTED] een haalbare strategie is voor het ontwikkelen van een veilig levend geattenuëerd virus vaccin voor toediening bij zeer jonge kinderen

**Dierproef****Welke concrete vraag / vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden?**

1. Kan beschermende immuniteit tegen RSV infectie opgewekt worden via [REDACTED] toediening van het [REDACTED] RSV vaccin?
2. Is [REDACTED] RSV noodzakelijk voor het opwekken van een beschermende immuunrespons?
3. Hoe verhoudt de immuunrespons zich ten opzichte van de dosis na [REDACTED] toediening van [REDACTED] RSV en [REDACTED] RSV?
4. Waar vindt replicatie van het [REDACTED] plaats en wat is de routing van het vaccin na intranasale toediening (in vivo imaging)?
5. Is er verschil in plaats van replicatie en routing na [REDACTED] toediening vergeleken met de intranasale toediening (in vivo imaging)?
6. Zijn we in staat met [REDACTED] formuleringen via de [REDACTED] route een beschermende immuunrespons op te wekken?
7. Wat is de kwaliteit van de mucosale immuunresponsen na intranasale en [REDACTED] immunisatie?
8. Wat is het effect van de route / formulering op de opname van het vaccin en verder processing door het lichaam (in vivo imaging).

**Geef aan waarom deze vraag dient te worden beantwoord met behulp van een dierproef en waarom middels het voorgestelde diersoort.**

Het afweersysteem is een complex van witte bloedcellen (o.a. T- en B-cellen) en antistoffen die reageren met elkaar en met hun milieu waarin de virus infectie en verspreiding plaats vindt. In vitro - of computermodellen kunnen de hierdoor ontwikkelde bescherming tegen infecties niet nabootsen. Omdat pathologie en gevoeligheid van katoenratten voor humaan RSV erg lijken op die van de mens wordt de werkzaamheid de vaccin kandidaten onderzocht in het katoenrat model.

**Geef aan hoe de vraagstelling van de dierproef gerelateerd is aan de vraagstelling van het project. Noem hierbij eventueel aannames die nodig zijn om het verband te leggen of relevante bevindingen van voorgaande proeven onder vermelding van bijbehorend proefopzetnummer.**

Het doel van dit project is het ontwikkelen van een effectief en veilig RSV-vaccin voor met name zeer jonge kinderen. De gebruikelijke toedieningsroute van een potentieel RSV-vaccin is intranasaal. Echter heeft intranasale toediening van een vaccin enkele nadelen, zoals de kans op benauwdheid en tijdelijke bijwerkingen als gevolg van redirectie van het vaccin virus naar zenuwbanen vlak achter de neus. Met name door het feit dat jonge baby's neusobligate ademers zijn gedurende de periode dat zij nog borstvoeding krijgen en daardoor het risico bestaat op benauwdheid na intranasale vaccinatie is voor de farmaceutische industrie reden geïnteresseerd te zijn in alternatieven voor intranasale vaccinatie, omdat dergelijke benauwdheid aanleiding kan geven tot het melden van vaccin gerelateerde complicaties [REDACTED]

Voorgaande experimenten hebben de potentie van een [REDACTED] aangetoond. In de experimenten [REDACTED] is de mogelijkheid onderzocht via [REDACTED] toediening van een RSV-vaccin een immuunrespons op te wekken. Na een enkele [REDACTED] immunisatie [RSV-] bleek 50% van de dieren bescherming tegen challenge virus te hebben in de long. De VN-titers bleken echter significant lager te zijn dan na intranasale toediening ([REDACTED]) van dezelfde dosis [RSV-] en ook in de neus blijkt in alle gevallen nog virus aanwezig te zijn waar na intranasale toediening alle dieren negatief zijn. Na een booster immunisatie blijken alle dieren bescherming te hebben opgebouwd in de longen. In experiment [REDACTED] bleek dat al na een enkele immunisatie van [RSV-] ([REDACTED] dosis) een vergelijkbare bescherming in de long opgewekt te zijn. In de huidige proefopzet willen we de [REDACTED] onderzoeken voor prototype vaccin [REDACTED] en de mate van bescherming vergelijken met enerzijds de intranasale route (dosis bepaald a.d.h. resultaten [REDACTED]) en anderzijds het [REDACTED] ook na [REDACTED] toediening.

Naast effectiviteit van het vaccin is het ook van belang te weten wat het vaccin in het lichaam doet en welke route het volgt om een optimale respons te bewerkstelligen. Met name bij dit vaccin concept, waarbij de [REDACTED] een belangrijke rol speelt, willen we onderzoeken waar en in welke mate het vaccin virus na toediening [REDACTED] ondergaat. Een mooie techniek waarbij we bovenstaande vragen in een levend dier kunnen onderzoeken is middels in vivo imaging, waarbij het vaccin dat is gelabeld met een IR-dye kunnen volgen vanaf het moment van inoculatie. Door fluorescente constructen van het vaccin virus te gebruiken, waarbij fluorescent eGFP in het genoom van het virus is ingebouwd, kunnen we tegelijkertijd ook replicatie van het vaccin in vivo volgen. De vragen die bestaan met [REDACTED] kunnen middels dit experiment beantwoord worden. Ook de verschillen tussen de toedieningsroutes kunnen op deze manier nader onderzocht worden.

Voor de [REDACTED] is er aan de formuleringszijde nog veel winst te behalen. Wanneer uit het eerste deel van dit experiment blijkt welke vaccindosis na [REDACTED] toediening bescherming biedt tegen RSV infectie zal onderzoek gedaan worden hoe we de [REDACTED]

[REDACTED]

**PROEFOPZET**

**Uit de antwoorden op de hieronder geformuleerde vragen dient duidelijk te worden dat deze proef de potentie heeft om de eerder geformuleerde vraagstelling van de dierproef te beantwoorden. Om de leesbaarheid te bevorderen dienen minder algemeen gebruikte afkortingen verklaard te worden.**

**Beschrijf de experimentele- en controlegroep(en) en de (be)handelingen die zij ondergaan.**  
(zie ook schematisch overzicht onder 'uitvoering')

afkortingen:

RSV- [REDACTED] - recombinant Respiratoir Syncytieel Virus (levend verzwakt)

[REDACTED] RSV - [REDACTED] RSV

[REDACTED] RSV - [REDACTED] RSV [REDACTED]

i.n. - intranasaal

**DEEL 1**

groepnummer - vaccin - dosis - route - rationale

- 1 - mock - dosis [REDACTED] - i.n. - negatieve controle (geen bescherming)
- 2 - [REDACTED] RSV - dosis [REDACTED] - i.n. - positieve controle (100% bescherming)
- 3 - [REDACTED] RSV - dosis [REDACTED] - i.n. - positieve controle (100% bescherming)
- 4 - [REDACTED] RSV - dosis [REDACTED] - [REDACTED] - positieve controle, bescherming in long (ut experiment [REDACTED])
- 5 - [REDACTED] RSV - dosis [REDACTED] - [REDACTED] - geeft bescherming na intranasale toediening, [REDACTED]
- 6 - [REDACTED] RSV - dosis [REDACTED] - [REDACTED] - geeft bescherming na intranasale toediening, [REDACTED]
- 7 - [REDACTED] RSV - dosis [REDACTED] - [REDACTED] - geeft bescherming na intranasale toediening, [REDACTED]
- 8 - [REDACTED] RSV - dosis [REDACTED] - [REDACTED] - geeft bescherming na intranasale toediening, [REDACTED]
- 9 - [REDACTED] RSV - dosis [REDACTED] - [REDACTED] - geeft bescherming na intranasale toediening, [REDACTED]
- 10 - [REDACTED] RSV - dosis [REDACTED] - [REDACTED] - geeft bescherming na intranasale toediening, [REDACTED]

Op dag 0 worden alle dieren gevaccineerd met RSV vaccin van de betreffende groep ([REDACTED]).

Op dag 28 worden alle dieren geïnfecteerd met wildtype RSV ([REDACTED] intranasaal).

Na de infectie (dag 33) worden alle dieren geëuthaniseerd en worden immuunresponsen, longpathologie en virusreplicatie geanalyseerd.

**DEEL 2**

groepnummer - vaccin - route - rationale

- 11 - free dye - i.n. - negatieve controle
- 12 - free dye - [REDACTED] - negatieve controle
- 13 - [REDACTED] RSV-IR dye - i.n. - welke route legt het antigeen af?, waar en in welke mate vindt replicatie plaats?
- 14 - [REDACTED] RSV-IR dye - [REDACTED] - welke route legt het antigeen af?, waar en in welke mate vindt replicatie plaats?
- 15 - [REDACTED] RSV-IR dye - i.n. - welke route legt het antigeen af?, waar en in welke mate vindt replicatie plaats?
- 16 - [REDACTED] RSV-IR dye - [REDACTED] - welke route legt het antigeen af?, waar en in welke mate vindt replicatie plaats?

Op dag 0 worden alle dieren gevaccineerd met RSV vaccin van de betreffende groep (10 µl).

Op dag 0 t/m 3 zullen de dieren onder de in vivo imager gelegd worden voor trafficking van het vaccivirus.

Op dag 7 zullen alle dieren geëuthaniseerd worden en worden relevante organen geïsoleerd.

**DEEL 3a**

groepnummer - vaccin - route

- 17 - mock - i.n.
- 18 - [REDACTED] RSV - i.n.
- 19 - [REDACTED] RSV - [REDACTED]
- 20 - [REDACTED] RSV formulering 1 - [REDACTED]
- 21 - [REDACTED] RSV formulering 2 - [REDACTED]

**DEEL 3b**

22 - mock - i.n.

23 - [REDACTED] RSV - i.n.

24 - [REDACTED] RSV - [REDACTED]

25 - free IR dye - [REDACTED]

26 - [REDACTED] RSV-IR dye - [REDACTED]

27 - [REDACTED] RSV-IR dye formulering 1 - [REDACTED]

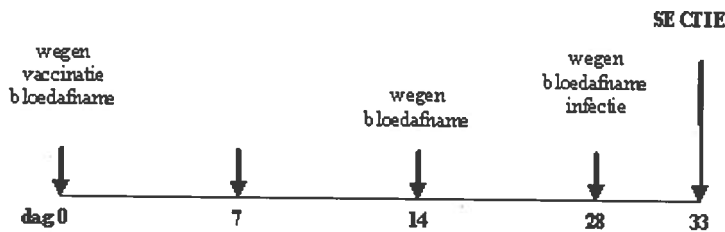
28 - [REDACTED] RSV-IR dye formulering 2 - [REDACTED]

**Geef aan hoe de resultaten statistisch worden geanalyseerd.**

Statistische analyse zal uitgevoerd worden met de resultaten van de ELISA's, virus-neutralisatie assays, virologie en histopathologie. De data zal getest worden op een normale verdeling (Gauss-curve). Wanneer verschillen tussen bepaalde groepen bepaald zullen worden zal dit met een ongepaarde test zijn. Wanneer binnen een groep het effect van de behandeling getest wordt zal dit een gepaarde test zijn. In het geval van een normale verdeling zal een onafhankelijke T-test of 'one-way ANOVA' gebruikt worden voor ongepaarde groepen en een 'repeated measurements ANOVA' voor de gepaarde groepen. Bij een niet-normale verdeling zal een Mann-Whitney U of Kruskal-Wallis test gebruikt worden (ongepaard) of een Wilcoxon T-test (gepaard).

Alle groepen zullen getest worden om een significant verschil aan te tonen met de controle mock-groep. De verschillende behandelingen zullen met elkaar vergeleken worden om het effect van de verschillende vaccins en/of doses te analyseren.

**Schets het 'experimental design' van de dierproef, zodat de essentie van de proefopzet duidelijk wordt.**

**DEEL 1**

dag 0:

wegen+bloedafname + vaccinatie

dag 14:

wegen+bloedafname

dag 28:

wegen+bloedafname + infectie (■ RSV)

dag 33:

sectie; verzamelen organen t.b.v. immuunrespons, virus replicatie en pathologie

serum -> systemische RSV-specifieke antistoffen

NAL (neus) -> mucosale RSV-specifieke antistoffen, virus replicatie

milt -> analyse witte bloedcellen

long -> virus titer, analyse witte bloedcellen, histologie, mucosale RSV-specifieke antistoffen

**DEEL 2**

voorafgaand aan het experiment zal de buikregio (delen met lymfoide organen) van alle dieren geschoren worden.

dag 0:

wegen + vaccinatie

in vivo imaging op meerdere tijdstippen (15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h en 6h na toediening)

dag 1 + 2 + 3:

in vivo imaging

dag 7:

sectie; verbloeden onder anesthesie, verzamelen van relevante organen.

**DEEL 3a**dag 0:

wegen+bloedafname + vaccinatie

dag 14:

wegen+bloedafname

dag 28:

wegen+bloedafname + infectie (■ RSV)

dag 33:

sectie; verzamelen organen t.b.v. immuunrespons, virus replicatie en pathologie

serum -> systemische RSV-specifieke antistoffen

NAL (neus) -> mucosale RSV-specifieke antistoffen, virus replicatie

milt -> analyse witte bloedcellen

BALT (long) -> virus titer, analyse witte bloedcellen, histologie

**DEEL 3b**

voorafgaand aan het experiment zal de buikregio van de dieren uit groep 25 t/m 28 geschoren worden.

dag 0:

wegen + vaccinatie

GR 25 t/m 28: in vivo imaging op meerdere tijdstippen (15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h en 6h na toediening)

dag 1 + 2 + 3:

GR 25 t/m 28 in vivo imaging

dag 28

sectie: verbloeden onder anesthesie, verzamelen organen t.b.v. immuunresponsen (milt, NALT (neus), BALT (long))

**Is voor de opzet van de proef overleg gepleegd met een statisticus? Zo ja, met wie? Zo nee, waarom niet?**

**Welke randomisatie maatregelen zijn er genomen t.a.v. groepsindeling en volgorde van experimentele handelingen? Indien geen maatregelen zijn genomen, geef aan waarom.**

Alle dieren zijn afkomstig uit eigen fok. Dieren worden na verspenen individueel gehuisvest waardoor gerichte selectie van geslacht en leeftijd mogelijk is. Bij het indelen van de groepen wordt gerandomiseerd voor leeftijd en geslacht.

**Zijn er nevenfactoren, zoals verschil in huisvesting of verschil in behandelingstijdstippen tussen experimentele- en controle groep(en), die de behandelingseffecten ongewild zouden kunnen verstoren?** Kruisbesmetting van virussen tussen de verschillende groepen is mogelijk. Dit wordt voorkomen (zie onder). Het experiment zal in delen worden uitgevoerd uit praktische overwegingen. Dit wordt zodanig gedaan dat dit geen neveneffect zal geven.

**Welke maatregelen zijn genomen om de aanwezigheid van nevenfactoren te voorkomen? Indien geen maatregelen zijn genomen, geef aan waarom.**

Voorkomen kruisbesmetting: Dieren worden individueel en afgesloten van elkaars microbiologie (d.m.v. filtertop) gehuisvest. Daarnaast is de volgorde van handelen van niet besmet naar besmet.

Voorkomen tijdeffect bij opdelen experiment: Per handeling zullen een gelijk aantal dieren van alle verschillende groepen behandeld en geanalyseerd worden. Dit maakt het mogelijk dat per tijdstip (een gelijk deel van) alle groepen eerlijk met elkaar vergeleken kunnen worden.

**Geef een motivatie voor het aantal dieren (bv. met behulp van een power-analyse).**

Voor de virustiters zijn aan de hand van resultaten van eerdere experimenten gemiddelden en standaard deviaties te berekenen. De noodzaak voor het inzetten van 6 dieren per groep in dit experiment van korte duur is berekend volgens een power analyse onder de condities;

Power : 0.8

Alpha: 0.05

berekend met sample size calculator: averages, two samples (website:

[http://www.dssresearch.com/toolkit/sscalc/size\\_a2.asp](http://www.dssresearch.com/toolkit/sscalc/size_a2.asp) )

Voor de [REDACTED] en [REDACTED] vaccins is in eerdere experimenten [REDACTED] met dezelfde challenge dosis een standaard deviatie van 1.2 gevonden in de titers van de challenge virus replicatie. Bescherming tegen challenge visus replicatie in de longen is de belangrijkste parameter in dit experiment. Voor de experimentele groepen willen wij tussen de samples een verschil van minimaal 0.4 log in de virus titers aan kunnen tonen. Dit levert (gebruikmakend van de sample size calculator) een groeps grootte van 6 dieren op.

**Vat samen hoe u de vraagstelling van de dierproef denkt te kunnen beantwoorden met de voorgestelde proefomschrijving. Speculeer daarbij over mogelijke uitkomsten (bijvoorbeeld verhogend dan wel verlagend effect van de behandeling) en hoe elk van deze mogelijke uitkomsten antwoord geeft op de vraagstelling(en) van de dierproef.**

- De vergelijking van [REDACTED] en [REDACTED] RSV gevaccineerde dieren met de mock-gevaccineerde dieren zal het effect van de vaccins op de immuunrespons en de mate van bescherming laten zien (vraagstelling 1).
- De vergelijking tussen [REDACTED] RSV gevaccineerde dieren zal antwoord geven op de vraag of [REDACTED] is voor het opwekken van bescherming (vraagstelling 2).
- De [REDACTED] dosis van het ongezuiverde [REDACTED] RSV vaccin gaf in eerdere experimenten bescherming in de longen na [REDACTED] toediening. Het is de vraag welke dosering nodig is voor het nog verder geattenuerde [REDACTED] RSV vaccin, al dan niet [REDACTED]. Vandaar dat we drie verschillende doses testen (vraagstelling 3).
- Door het gelabelde fluorescente GFP-vaccin constructen te volgen in de tijd direct na intranasale en [REDACTED] toediening, kan middels in vivo imaging gekeken worden waar en in welke mate replicatie van het vaccin virus plaats vindt. De vergelijking tussen de toedieningsroutes zal uitwijzen of er verschil in processing en routing van het antigen is (vraagstelling 4 en 5).
- Met innovatieve [REDACTED] formuleringen willen we de [REDACTED] toediening optimaliseren. De vergelijking van deze formuleringen met de mock-gevaccineerde dieren zal de werkzaamheid van deze formuleringen en de mate van bescherming laten zien na RSV infectie (vraagstelling 6).
- Om een duidelijk beeld te krijgen van de immuunrespons die is opgewekt door ons vaccin zouden we de lokale immuunrespons willen analyseren zonder dat er een RSV infectie heeft plaats gevonden. In het laatste deel van dit experiment zal er met nieuwe immunologische technieken die binnen [REDACTED] (en [REDACTED] zijn opgezet in detail gekeken worden naar de mucosale en cellulaire immuunresponsen die zijn opgewekt na intranasale en [REDACTED] immunisatie. De vergelijking met ongevaccineerde dieren zal informatie geven over de kwaliteit van de immuunrespons (vraagstelling 7).
- De innovatieve [REDACTED] formuleringen zullen moeten zorgen voor een [REDACTED]. Middels in vivo imaging zal gekeken worden in hoeverre deze formuleringen dezelfde route volgen als de vloeibare formulering (vraagstelling 8).

**Geef tot slot een beknopte samenvatting van het doel van het project en de concrete vraag die met de dierproef beantwoord moet worden (maximaal 5 regels). Deze samenvatting wordt opgenomen in het DEC advies en in de jaarlijkse reportage van de DEC aan de Inspectie.**

RSV is een van de belangrijkste veroorzakers van ernstige luchtwegaandoeningen bij jonge kinderen en ouderen. Daarom wordt er binnen dit project een vaccinstrategie onderzocht en ontwikkeld, die bescherming kan bieden tegen RSV-infectie. Hoewel intranasale toediening de gebruikelijke route is voor RSV-vaccinatie wordt de

mogelijkheid onderzocht voor de [REDACTED] [REDACTED] Intrasale toediening heeft enkele nadelen, zoals de kans op benauwdheid en nare bijwerkingen.

[REDACTED]

**Bijzonderheden t.b.v. de wetenschappelijke toetsingscommissie (WTC)**

**Bijzonderheden t.b.v. de dierexperimentencommissie (DEC)**



**UITVOERING**

Geef een overzicht van de experimentele handelingen ten behoeve van de uitvoering van de dierproef door biotechnici.

**ALGEMEEN**

- Dieren zullen voorafgaand aan de bloedafname en euthanasie worden gewogen.
- Planning voor vaccinatie, infectie en sectie zal gemaakt worden in overleg met ARC.
- Intravacc levert op afgesproken tijden de virussuspensie voor immunisatie en infectie en zal hierbij aanwezig zijn.
- Opsplitsing van groepen zal in overleg zijn met ARC, zodat de verschillende delen van het experiment op verschillende tijden ingepland kunnen worden.
- Contact [REDACTED] [REDACTED]

**BIOTECHNIEK**

|                 |                                                                    |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------|
| Aankomst        | Dieren identificeren via kooinummers met groep- en diernummer      |
| Verdeling       | Individueel huisvesten in Macrolon bakken type III onder filtertop |
| Acclimatisering | Minimaal 3 dagen, liefst een week                                  |

**BIJZONDERE BIOTECHNIEK****Pilot-studie**

De volgende vraagstellingen zullen we voorafgaand aan de eigenlijke studie willen beantwoorden:

- Is het mogelijk om zowel GFP als 800CW (Near infrared) gelijktijdig zichtbaar te maken?
- Is het mogelijk om GFP en 800CW zichtbaar te maken onder een laag weefsel?
- Wat is de dosis IR-gelabeld (800CW) RSV die we moeten inoculeren om in de long, de neus en de mondholte van de katoenrat een signaal te detecteren na [REDACTED] en intranasale toediening?

De eerste twee vragen kunnen we beantwoorden zonder gebruik te maken van proefdieren, maar door het meten van IR-gelabeld RSV (800 CW) onder een toenemend aantal laagjes rosbief om zo de doordringbaarheid van het IR-signaal door weefsel te imiteren.

De derde vraagstelling vereist dat we levende katoenratten via de [REDACTED] of intranasale route inoculeren met verschillende doses gelabeld RSV en deze dieren vervolgens in de PhotonIMAGER™ te meten. Hiervoor zouden per route graag gebruik willen maken van 6 katoenratten (3 doses, 2 katoenratten per dosis). In totaal komen we dan uit op 12 katoenratten in het pilotexperiment.

Deze katoenratten zullen onder anesthesie geïnoculeerd worden met RSV welke GFP tot expressie brengt en gelabeld is met 800 CW. De dieren zullen vervolgens gedurende een periode van 3 dagen een aantal malen gemeten worden in de PhotonIMAGER™. Deze tijdstippen zijn gelijk aan die van de metingen in studie 2 (15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 24h, 48h, 72h). Op deze manier krijgen we <sup>i)</sup> een beeld van de mogelijkheid om RSV middels GFP expressie en 800CW labeling zichtbaar te maken (replicatie en biodistributie) in de verschillende organen van de katoenrat, <sup>ii)</sup> een goed idee van de dosis RSV die we moeten inbrengen om het signaal goed te kunnen detecteren, en bovendien <sup>iii)</sup> een beeld van de meest belangrijke tijdstippen voor het meten van de replicatie en biodistributie van RSV in de katoenrat. Dit laatste punt is belangrijk aangezien deze kennis mogelijk kan worden gebruikt om een aantal meetpunten in studie 2 te excluderen, waarmee het ongerief voor de proefdieren verder wordt beperkt.

Op dag 3 zullen de dieren geëuthanaseerd worden (verbloeden onder anesthesie). Alle handelingen en keuze voor anesthesie en dergelijke zullen zijn zoals staat beschreven bij deel 2 van proefopzet [REDACTED].

**DEEL 1**





**DEEL 3a**

| KATOENRAT |   |         | VACCINATIE |                      |        | OVERIGE HANDELINGEN        |                               |                  |                                       |
|-----------|---|---------|------------|----------------------|--------|----------------------------|-------------------------------|------------------|---------------------------------------|
| GR        | n | Diernr  | Route      | Vaccin               | Volume | Bloedafname<br>dag 0-14-28 | [REDACTED] infectie<br>dag 28 | Sectie<br>Dag 33 |                                       |
| 17        | 6 | 97-102  | i.n.       | Mock                 | 10 µl  | 200 µl                     | i.n.                          | 100 µl           | Bloed<br>(max)<br>NAL<br>Milt<br>Long |
| 18        | 6 | 103-112 | i.n.       | RSV                  | 10 µl  | 200 µl                     | i.n.                          | 100 µl           |                                       |
| 19        | 6 | 113-118 | [REDACTED] | RSV                  | 10 µl  | 200 µl                     | i.n.                          | 100 µl           |                                       |
| 20        | 6 | 119-124 | [REDACTED] | RSV<br>formulering 1 |        | 200 µl                     | i.n.                          | 100 µl           |                                       |
| 21        | 6 | 125-130 | [REDACTED] | RSV<br>formulering 2 |        | 200 µl                     | i.n.                          | 100 µl           |                                       |

Zie voor bijzondere biotechniek tabel deel 1.

**DEEL 3b**

| KATOENRAT |   |         | VACCINATIE |                             |        | OVERIGE HANDELINGEN    |                                    |
|-----------|---|---------|------------|-----------------------------|--------|------------------------|------------------------------------|
| GR        | n | Diernr  | Route      | Vaccin                      | Volume | Dag 0<br>Dag 1 – 2 – 3 | Sectie<br>Dag 28                   |
| 22        | 6 | 131-136 | i.n.       | mock                        | 10 µl  | -                      | Bloed (max)<br>NAL<br>Milt<br>Long |
| 23        | 6 | 137-142 | i.n.       | RSV                         | 10 µl  |                        |                                    |
| 24        | 6 | 143-148 |            | RSV                         | 10 µl  |                        |                                    |
| 25        | 6 | 149-154 |            | Free IR dye                 | 10 µl  | In vivo imaging        |                                    |
| 26        | 6 | 155-160 |            | RSV-IR dye                  | 10 µl  |                        |                                    |
| 27        | 6 | 161-166 |            | RSV-IR dye<br>formulering 1 |        |                        |                                    |
| 28        | 6 | 167-172 |            | RSV-IR dye<br>formulering 2 |        |                        |                                    |

| ACTIE           | TIJDSTIP    |                 |                                 |         | TOELICHTING (DEEL 3b)                                                                              |
|-----------------|-------------|-----------------|---------------------------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                 | d<br>0      | d1-3            | D<br>7                          | D2<br>8 |                                                                                                    |
| Controle        | Dagelijks   |                 |                                 |         | Dagelijks controleren op algemeen welbevinden                                                      |
| Anesthesie      | +           | +               | g<br>r<br>2<br>5<br>-<br>2<br>8 | +       | Gasanesthesie: isofluraan/O2                                                                       |
|                 | +           | -               | -                               | -       | Ketamine + xylazine (KR-injectie)                                                                  |
| Scheren         | gr25-2<br>8 | -               | -                               | -       | Voorafgaand aan vaccinatie (isofluran/O2)                                                          |
| Wegen           | +           | -               | +                               | +       | Voorafgaand aan bloedafname (isofluran/O2)                                                         |
| Bloedafname     | +           | -               | +                               | -       | 200 µl bloed (voor serum) via orbitapunctie (onder isofluran/O2)                                   |
|                 | -           | -               | -                               | +       | Maximale hoeveelheid bloed bij verbloeden                                                          |
| In vivo imaging | gr25-2<br>8 | gr2<br>5-2<br>8 | g<br>r<br>2<br>5<br>-<br>2<br>8 | -       | Dieren worden onder Biospace imager gelegd en gescand (isofluran/O2) <b>alleen groep 25 t/m 28</b> |
|                 |             |                 |                                 |         | Intranasaal: 10 µl vaccin/free dye, 5 µl/neusgat<br>[REDACTED]                                     |

|                     |   |   |   |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------|---|---|---|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Vaccinatie          | + | - | - | - | <div style="background-color: black; width: 250px; height: 30px; margin-bottom: 5px;"></div> <p>NB: Eerste uur na vaccinatie dieren ontzien van water en voeding</p> <p>Ter controle op exacte dosis en stabiliteit 10 µl vaccin met dezelfde pipet in aangeleverde terug titratie ampul/groep z.s.m. bij kamertemperatuur terug.</p> |
| Euthanasie (sectie) | - | - | - | + | <ul style="list-style-type: none"><li>• Isofluraan/O2 anesthesie gevolgd door KR-injectie.</li><li>• Dieren verbloeden</li><li>• Neuswassingen (NAL)</li><li>• Isolatie milt / long</li></ul> <p>Ook bij niet-geplande euthanasie worden de dieren verbloed en wordt sectie verricht.</p>                                             |

| Stam                   | COT/NCrIVsiRiv                                                         | COT/NCrIVsiRiv                                                         | COT/NCrIVsiRiv                                                         | COT/NCrIVsiRiv                                                         |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Geslacht               | 50-50                                                                  | 50-50                                                                  | 50-50                                                                  | 50-50                                                                  |
| Aantal                 | 60                                                                     | 36                                                                     | 30                                                                     | 42                                                                     |
| Leeftijdswaak (weken)  | 4-8 wkn                                                                | 4-8 wkn                                                                | 4-8 wkn                                                                | 4-8 wkn                                                                |
| Gewichtswaak (grammen) |                                                                        |                                                                        |                                                                        |                                                                        |
| Microb. status         | spf                                                                    | spf                                                                    | spf                                                                    | spf                                                                    |
| Herkomst               | <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> | <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> | <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> | <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> |
| Locatie                | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span>       | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span>       | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span>       | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span>       |
| Kooitype               | filtertop,<br>macrolon III                                             | filtertop,<br>macrolon III                                             | filtertop,<br>macrolon III                                             | filtertop,<br>macrolon III                                             |

Speciale wensen t.a.v. de proefdieren:

|                                  |                                                                        |                                                                        |                                                                        |                                                                        |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <b>Leeftijdswaak</b><br>(weken)  | 4-8 wkn                                                                | 4-8 wkn                                                                | 4-8 wkn                                                                | 4-8 wkn                                                                |
| <b>Gewichtswaak</b><br>(grammen) |                                                                        |                                                                        |                                                                        |                                                                        |
| <b>Microb. status</b>            | spf                                                                    | spf                                                                    | spf                                                                    | spf                                                                    |
| <b>Herkomst</b>                  | <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> | <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> | <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> | <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> |
| <b>Locatie</b>                   | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span>       | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span>       | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span>       | <span style="background-color: black; color: black;">XXXX</span>       |
| <b>Kooitype</b>                  | filtertop,<br>macrolon III                                             | filtertop,<br>macrolon III                                             | filtertop,<br>macrolon III                                             | filtertop,<br>macrolon III                                             |

**Speciale wensen t.a.v. de proefdieren:**

Levens of gevreesd micro-organisme? Levens

Klasse biologische agentia volgens ARBO besluit 2005: Klasse 2

Is er sprake van een Genetisch Gemodificeerd Micro-Organisme?: Ja

Inschalings niveau volgens Regeling en besluit GGO?: ML-II

Lokatie DM-2 diervverblijf: [REDACTED]

Wat is het GGO vergunning nummer voor dit micro-organisme?: [REDACTED]

Wie is de verantwoordelijke medewerker: [REDACTED]

**Biologisch materiaal:**

Wordt er in het kader van de dierproef biologisch materiaal ingebracht?: Ja

Wat voor een materiaal (+ event. code)?: [REDACTED] RSV, [REDACTED] RSV, wildtype RSV, [REDACTED] RSV, [REDACTED] RSV, [REDACTED] RSV, [REDACTED] RSV, recombinant [REDACTED] RSV, [REDACTED]

**Bijzonderheden t.b.v.MKB:**

**AGENTIA**

| Stofnaam                 | Chemisch/Biologisch materiaal? | Klassificatie   |
|--------------------------|--------------------------------|-----------------|
| recombinante RSV stammen | Biologisch                     | risico klasse 2 |
| wildtype RSV             | Biologisch                     | risico klasse 2 |
|                          |                                |                 |

**1. Welke maatregelen zijn er te nemen ter bescherming persoon en omgeving?**

Bij vaccin toedieningen werken in laminaire flowkast (BHK).

**2. Vindt er uitscheiding plaats via urine, faeces, longen, bloed of haar?Ja**

**Zo ja, via wat en hoelang?(dagen)**Gedurende de eerste week na vaccinatie en/of infectie RSV is uitscheiding van virus via de longen/neus mogelijk.

**3. Welke maatregelen moeten er genomen worden bij besmetting huid, ogen of prikaccident?**

Huid: wassen met water en desinfecterende zeep of met desinfecterende gel

RSV besmetting ogen: schoonspelen met veel water

Prikincident: laten bloeden en wassen met water en zeep

**4. Welke maatregelen moeten er genomen worden bij morsen op kleding, vloer, tafel, etc. ?**

RSV: desinfecteren met 70% ethanol

**5. Hoe moet de stof zelf, gecontamineerde bedding en kadavers afgevoerd worden?**

Afvoeren als potentieel besmet materiaal. Aan het einde van de proef alle proefdierhuisvesting materialen, bedding enz. autoclavieren en daarna omspoelen. Kadavers ook voor afvoeren autoclavieren.



|                                                                                                   |                                                     |                 |        |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------|--------|------|
| (n=168)                                                                                           | anesthesie (KR)                                     |                 |        |      |
| 3) vaccinatie i.n. <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> (n=168) | 4) i.n. toediening onder anesthesie (isofluraan/O2) | 4) gering/matig | <5 min | 100% |
| 4) infectie (n=90)                                                                                | 5) scheren buikregio onder anesthesie               | 5) matig        | <5 min | 100% |
| 5) scheren (n=60)                                                                                 | 6) scannen onder anesthesie                         | 6) gering/matig | <5 min | 100% |
| 6) in vivo imaging (n=60)                                                                         | 7) verbloeden onder anesthesie                      | 7) gering/matig | <5 min | 100% |
| 7) euthanasie (n=168)                                                                             |                                                     |                 |        |      |

| Ongerief door andere omstandigheden dan strikt de experimentele handelingen |                       |               |               |               |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|
| Omstandigheid                                                               | Aard van het ongerief | Mate ongerief | Duur ongerief | Kans ongerief |
| longpathologie a.g.v. RSV infectie                                          | longpathologie        | gering/matig  | 1 week        | 100%          |

| Gecumuleerd risico op ongerief voor het hele experiment / per experimentele groep |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|
| alle dieren in experiment                                                         | matig |

**Anesthesie:**

Worden de dieren tijdens de dierproef onder anesthesie gebracht?

Ja

Geef een specificatie van de anesthesie die wordt gebruikt per dierexperimentele handeling.

|   | Anesthesie keuze    |      | Handeling(en)                                 |
|---|---------------------|------|-----------------------------------------------|
| 1 | ketamine + xylazine | voor | vaccinatie (dag 0)                            |
| 2 | isofluraan in O2    | voor | wegen, bloedafname, in vivo imaging, infectie |
| 3 |                     | voor |                                               |
| 4 |                     | voor |                                               |
| 5 |                     | voor |                                               |

**Analgesie:**

Zullen dieren als gevolg van de dierproef pijn ondervinden?: Nee

Gebruikt u een analgeticum?: Nee

**Kooiverrijking:**

Kooiverrijking wordt standaard toegepast! Is er bezwaar tegen toepassing van kooiverrijking? Nee

**Individuele huisvesting:**

Moeten de dieren individueel gehuisvest worden? Ja

Geef aan waarom dit noodzakelijk is.

Katoenratten zijn solitair levende dieren. Verder is het voor de handeling van de dieren dat ze individueel gehuisvest zijn.

**Klinische Effecten:**

Verwachte klinische effecten (gedetailleerd beschrijven a.u.b.):

Mogelijk wel, maar dan ten hoogste milde respiratoire aandoeningen.

Het gaat in dit experiment om een intranasale of XXXXXXXXXX infectie van XXXXXXXXXX RSV, al dan niet XXXXXXXXXX. Uit eerdere experimenten blijkt dat na toedienen van virussuspensie in klein volume de lagere luchtwegen niet wordt bereikt en blijft "hangen" in de neusholte en hogere luchtwegen. Dientengevolge zal een mogelijke inflammatoire reactie beperkt blijven tot de hogere luchtwegen, die hoogstens een paar dagen aanhoudt. In een deel van de dieren zal een soort "neusverkoudheid" optreden. Tot nu toe zijn na intranasale (challenge) infectie met XXXXXXXXXX-RSV geen klinische effecten waargenomen. De milde inflammatoire reactie in de longen na toediening van groot volume (100 ul) infectieus virus is slechts waarneembaar bij pathologisch onderzoek van de longpreparaten.

In geval van meer dan matig ongerief, wat zijn de humane eindpunten?

**Euthanasie:**

**Worden de dieren gedurende of aan het eind van de dierproef gedood? Ja**

**Geef een specificatie van de euthanasiemethode:** Verbloeden

**Gebeurt euthanasie onder anesthesie?: Ja**

**Geef een specificatie van de anesthesiemethode :** ketamine + xylazine

**Bijzonderheden:**

**Bijzonderheden t.b.v. art. 14**

De huisvesting, verzorging en biotechniek die noodzakelijk zijn voor dit onderzoek zijn bekend. Zo mogelijk proberen we de katoenratten in hun kooi te verdoven met isofluraan zodat ze niet gevangen hoeven te worden. In overleg met [REDACTED] biotechnici zal bekeken worden hoe deze mogelijkheid uitgevoerd kan worden met beschikbare middelen.

[REDACTED]

vindt er momenteel door u of door andere groepen onderzoek plaats naar mogelijkheden voor vervanging van proefdieren ter beantwoording van uw onderzoeksvraag?. (Voor zover dit elders gebeurt geef literatuurreferenties)

**Welke maatregelen zijn genomen ter vermindering en verfijning van het proefdiergebruik?**

ter vermindering;

- hebben we gewacht tot het productie proces zodanig is ontwikkeld dat het prototype materiaal zo veel mogelijk vergelijkbaar is met het materiaal waar de klinische studies mee uitgevoerd zullen gaan worden
- is een inschatting van de proefgroep grootte gemaakt door nauwkeurige statistische voorspelling (poweranalyse) om met een minimaal aantal dieren significante resultaten te verkrijgen op basis van eerdere data van soortgelijke experimenten die werden uitgevoerd in ons eigen lab.
- kunnen we middels in vivo imaging hetzelfde dier op meerdere tijdstippen bekijken en het antigeen na toediening volgen in het dier. Zo kan veel informatie gehaald worden uit minder dieren, omdat het dier niet elk tijdstip geofferd hoeft te worden.

ter verfijning;

- worden de dieren solitair geplaatst in kooien met zaagsel, waarin ze ad libitum kunnen eten en drinken.
- gebeuren alle handelingen onder anesthesie zodat dieren nauwkeuriger behandeld kunnen worden waardoor ook variatie minimaal gehouden wordt en dus minder dieren nodig zijn voor significantie van gericht geïnduceerde verschillen.

**Anesthesie:**

4. Is wel toegepast

**Pijnbestrijding, postoperatief  
of op ander tijdstip:**

1. Is niet toegepast (geen aanleiding)

**Mate van ongerief:**

3. Matig

| Aantal Dieren: | Mate van ongerief: |
|----------------|--------------------|
|                |                    |
|                |                    |
|                |                    |
|                |                    |
|                |                    |
|                |                    |

**Toestand dier na eind proef:**

1. Dood in de proef/dood na de proef

**BIJLAGEN**

opmerkingen.

Opmerkingen: Akkoord met proefopzet. Graag eerst een pilot uitvoeren met aandacht voor optimaliseren nieuwe techniek [REDACTED] en nieuwe opstelling (Biospace imager).

(27-12-2013 9:43:56) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]

(10-1-2014 13:49:06) Goedgekeurd door BVF functionaris [REDACTED]

(21-3-2014 15:45:30) Afgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED] met de volgende opmerkingen.

Opmerkingen: Is DEC-masterprotocol voor [REDACTED]

#### AUTORISATIE

##### Verantwoordelijke Art 12 functionaris:

(19-12-2013 14:18:50) Goedgekeurd door Artikel 12 functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

##### Verantwoordelijke onderzoeker (Art. 9)

Naam: [REDACTED]

Vervanger: [REDACTED]

(20-12-2013 10:12:01) Goedgekeurd door Artikel 9 functionaris [REDACTED]

Geannuleerd op - 25-03-2014 door [REDACTED]

##### WTC Autorisatoren:

Opmerkingen:

##### Offerte Autorisatoren:

(21-3-2014 15:45:30) Afgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED]

Bestelnummer:

Opmerkingen:

Is DEC-masterprotocol voor [REDACTED]

##### MKB Autorisatoren:

(27-12-2013 9:43:56) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

##### BVF Autorisatoren:

[REDACTED]

(10-1-2014 13:49:06) Goedgekeurd door BVF functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

##### Art. 14 Autorisatoren:

(12/20/2013 11:22:20 AM) Goedgekeurd door A14 functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

Akkoord met proefopzet. Graag eerst een pilot uitvoeren met aandacht voor optimaliseren nieuwe techniek [REDACTED] en nieuwe opstelling (Biospace imager).

##### DEC Autorisatoren:

(27-12-2013 9:43:56) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]

(10-1-2014 13:49:06) Goedgekeurd door BVF functionaris [REDACTED]

(21-3-2014 15:45:30) Afgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED] met de volgende opmerkingen.  
Opmerkingen: Is DEC-masterprotocol voor [REDACTED]

## AUTORISATIE

### Verantwoordelijke Art 12 functionaris:

(19-12-2013 14:18:50) Goedgekeurd door Artikel 12 functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

### Verantwoordelijke onderzoeker (Art. 9)

Naam: [REDACTED]

Vervanger: [REDACTED]

(20-12-2013 10:12:01) Goedgekeurd door Artikel 9 functionaris [REDACTED]

Geannuleerd op - 25-03-2014 door [REDACTED]

### WTC Autorisatoren:

Opmerkingen:

### Offerte Autorisatoren:

(21-3-2014 15:45:30) Afgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED]

Bestelnummer:

Opmerkingen:

Is DEC-masterprotocol voor [REDACTED]

### MKB Autorisatoren:

(27-12-2013 9:43:56) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

### BVF Autorisatoren:

(10-1-2014 13:49:06) Goedgekeurd door BVF functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

### Art. 14 Autorisatoren:

(12/20/2013 11:22:20 AM) Goedgekeurd door A14 functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

Akkoord met proefopzet. Graag eerst een pilot uitvoeren met aandacht voor optimaliseren nieuwe techniek [REDACTED] en nieuwe opstelling (Biospace imager).

### DEC Autorisatoren:

Opmerkingen:

---

©Intravacc 2014 Alle rechten voorbehouden