

Proefopzet	[REDACTED]	Auteur:	[REDACTED]
Creatie:	08-01-2013	Laatste wijziging:	15-05-2013
Status proefopzet:	Goedgekeurd	Status experiment:	Afgesloten

ALGEMEEN**Project**

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

Dierproef

Titel dierproef: MWG 13-01; onschadelijkheid kinkhoest [REDACTED] vaccines met [REDACTED] endotoxine
Aard van de dierproef: 2-Onderdeel van een lopend project.
Dierproef behoort tot het onderzoek van het: IntraVacc
Lab/Unit/Afd: Intravacc
Geplande inzetdatum: 01-04-2013

Diernummers: 80
Duur dierproef: 28 dagen
Doorlooptijd proefopzet: 1 jaar of minder

Art. 9

Art. 9 Vervanger:

Art. 12:

Medewerkers:

Tijdschrijven op:

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

Sommige vaccins beschermen niet levenslang; de bescherming van een vaccin kan in de loop van de jaren afnemen. Dit komt mede doordat de circulatie van de ziekteverwekkers na invoering van algemene vaccinatie is afgenomen. De weerstand tegen de betreffende infecties wordt daarom niet, zoals vroeger wel het geval was, op een natuurlijke manier geboosterd (opgepept) door incidenteel contact met de ziekteverwekker. Hierdoor kunnen individuen toch infecties oplopen waartegen zij in het verleden gevaccineerd zijn. We zien dat fenomeen van teruglopende immuniteit bij de vaccinaties tegen kinkhoest. Wel verloopt de ziekte bij mensen die als kind gevaccineerd zijn over het algemeen veel minder ernstig dan bij ongevaccineerden.

De belangrijkste oorzaken voor de toename van kinkhoest zijn wegebbende immuniteit en veranderingen (adaptaties) in de pathogeenpopulatie. RIVM onderzoek heeft aangetoond dat de kinkhoestbacterie populatie veranderd is na de introductie van vaccinatie waardoor er een mismatch is ontstaan tussen de circulerende stammen en de vaccinstammen betreffende het pertussis toxine (PtxSA2 → PtxSA1) en pertactine (Prn1 → Prn2). Een tweede verandering in de bacteriepopulatie betreft de opkomst van de ptxP3 stammen die meer pertussis-toxine produceren. P3-stammen zijn waarschijnlijk virulenter en beter in staat om de afweer te onderdrukken dan PtxP1 stammen uit de prevaccinatie periode (mutatie Ptx promotor). De P3-stammen hebben zich recentelijk over de wereld verspreid en zijn verantwoordelijk voor de explosieve toename van kinkhoest in Nederland en vermoedelijk ook in andere landen. Het ligt voor de hand te veronderstellen dat de opkomst van deze escape-mutanten de effectiviteit van de huidige acellulaire (ACV) en whole cell vaccins (WCV) zullen verlagen.

Dit project heeft als doel een nieuw kinkhoestvaccin te ontwikkelen dat langdurig beschermt tegen kinkhoestinfectie, zo mogelijk niet alleen tegen ziekte maar ook tegen infectie waardoor de bacterie zich niet of veel minder snel kan aanpassen aan het nieuwe kinkhoestvaccin. Een [REDACTED] zou zo'n vaccin kunnen zijn omdat deze een brede samenstelling van beschermende antigenen heeft (nagenoeg gelijk aan een WCV) maar minder bijwerkingen veroorzaakt (vergelijkbaar met ACV). Daarnaast biedt een [REDACTED] vaccin meer mogelijkheden om de antigene samenstelling aan te passen met behulp van moleculair biologisch technieken omdat gedurende het productieproces het merendeel van het DNA verwijderd wordt (dit in tegenstelling tot een WCV) waardoor zowel de werkzaamheid als de veiligheid van het vaccin worden verbeterd. Binnen dit project wordt daarom ook onderzoek gedaan naar de werkzaamheid (immunogeniteit en bescherming) en veiligheid (toxiciteit) van kinkhoestantigenen zoals diverse toxines (o.a. [REDACTED] en [REDACTED]) en buitenmembraanantigenen (o.a. [REDACTED]). Parallel aan dit onderzoek zal een kinkhoest [REDACTED] productieproces (analoog aan het huidige [REDACTED] productieproces) worden ontwikkeld. Uiteindelijk zal dit onderzoek leiden tot een proof of concept van een kandidaat kinkhoest [REDACTED] vaccin dat, in samenwerking met een externe partner, kan worden uitontwikkeld tot een nieuw kinkhoestvaccin.

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

Wat is de optimale samenstelling qua werkzaamheid en veiligheid van een nieuw te ontwikkelen kinkhoest [REDACTED] vaccin dat langdurig beschermt (minder of geen boostervaccinaties) en zo mogelijk niet alleen ziekte maar ook de infectie bestrijdt?

Vermindert dit nieuwe type vaccin het risico dat de bacterie zich opnieuw aanpast aan het vaccin na introductie van dit vaccin?

Wat is het maatschappelijk belang van het project?

Kinkhoest of pertussis wordt veroorzaakt door de humaan specifieke bacterie *Bordetella pertussis*. Sinds de laatste twee decennia stijgt het aantal kinkhoestinfecties in goed gevaccineerde bevolkingen zoals de Nederlandse. Massavaccinatieprogramma's met cellulaire kinkhoestvaccins (WCV: whole cell vaccines) en later ook de acellulaire vaccins (ACV) hebben de epidemiologie van kinkhoest veranderd van een klassieke kinderziekte in een ziekte die alle leeftijdsgroepen kan treffen behalve degenen die recentelijk zijn gevaccineerd. Kinkhoestinfecties in adolescenten en volwassenen zijn meestal a-symptomatisch of veroorzaken slechts milde ziekte, maar geïnfecteerde volwassenen kunnen de bacterie wel overdragen aan ongevaccineerden zoals baby's. Kinkhoestinfecties bij baby's is een ernstige ziekte met hoge morbiditeit en mortaliteit en dus een serieus probleem.

Tussen 2005 en 2011 zijn in Nederland jaarlijks ca. 200 kinkhoestgevallen gemeld bij zuigelingen in de leeftijd tussen 0 en 2 maanden en ca. 100 in de leeftijd tussen 3 en 5 maanden. De eerste groep is ongevaccineerd; de tweede leeftijdsgroep gedeeltelijk. In 2012 is de incidentie nog verder toegenomen tot 9473 meldingen tot 28 juli (bron RIVM website) voor alle leeftijden ten opzichte van x meldingen over dezelfde periode in 2011. Het CIB heeft VWS hierover ingelicht via een nota (31 mei 2012 Stand van zaken kinkhoest(vaccinatie) in Nederland). Ook in andere westerse landen (zoals Canada, Verenigde staten, Argentinië, Australië, Israël, Noorwegen, Finland en

Zweden) wordt een verhoging van de kinkhoestincidentie waargenomen ([REDACTED]).

Wat is het wetenschappelijk belang van het project?

Gezien de beperkte beschermingsduur van de huidige WCV en ACV vaccins moeten nieuwe vaccinatiestrategieën worden ontwikkeld. Het doel van dit project is het ontwikkelen van een nieuw [REDACTED] kinkhoestvaccin op basis van de eigenschappen van de momenteel circulerende kinkhoeststammen. Deze zijn door [REDACTED] cs in kaart gebracht voor Nederland en lijken ook van toepassing op andere landen [REDACTED], [REDACTED]). Van klinisch isolaten (van de meest voorkomende kinkhoest stamvarianten) zal een [REDACTED] like [REDACTED] vaccin (of [REDACTED] vaccin worden gemaakt met gedetoxificeerd LPS. InTraVacc heeft deze technologie in de afgelopen jaren ontwikkeld voor het [REDACTED] vaccin. Onderzoek aan het [REDACTED] vaccin heeft laten zien dat een [REDACTED] vaccin met een gedetoxificeerd LPS minder bijwerkingen geeft dan een klassiek cellulair vaccin [REDACTED].

Met een [REDACTED] vaccin wordt vermeden dat het nieuwe of verbeterde kinkhoestvaccin een te smalle basis aan beschermende antigenen hebben of een suboptimale "memory immunity" induceren waardoor alleen ziekte en niet de infectie zelf wordt bestreden. Inzicht in het opwekken van lange termijn bescherming kan leiden tot een nieuwe generatie van geoptimaliseerde pertussis vaccins en vaccincomponenten (antigenen, hulpstoffen), immunisatie routes en vaccinatie schema's. Een [REDACTED] vaccin lijkt de voordelen van een WCV (bredere bescherming) en ACV (minder bijwerkingen) in zich te verenigen. Daarnaast is het mogelijk de antigene samenstelling van het vaccin met behulp van recDNA technieken zodanig aan te passen totdat de gewenste werkzaamheid en veiligheid is verkregen.

De vaccinstam(men) en het productieproces zullen stapsgewijs ontwikkeld worden en indien nodig zullen tussen producten getest worden op antigeenexpressie, werkzaamheid en veiligheid voordat een volgende stap wordt ingezet. Op basis van antigeen-expressie zijn 2 Nederlandse klinische isolaten geselecteerd als moederstam, nl: [REDACTED] uit [REDACTED] en [REDACTED] en [REDACTED] uit [REDACTED]. Naar aanleiding van het onderzoek van [REDACTED] en [REDACTED]) is gekozen voor een [REDACTED] en/of [REDACTED] LPS mutaties voor het verminderen van de endotoxiciteit. Voor het verbeteren van de werkzaamheid wordt onderzocht of het verhogen of verlagen van beschermende of immuunmodulerende antigenen zoals [REDACTED] en [REDACTED] een positief effect heeft op de beschermingsduur van het nieuw te ontwikkelen vaccin. Parallel hieraan wordt onderzocht of het mogelijk is de vesicle-vorming door de kinkhoestbacterie te verhogen (gelijk aan het [REDACTED]-vaccin) door het construeren van een "high blebber" stam (veranderingen aanbrengen in de [REDACTED] van het [REDACTED] aan de [REDACTED] door [REDACTED] weg te halen of hun structuur te veranderen. Voor zowel een high als low blebberende vaccinstammen zal het bestaande [REDACTED] productieproces worden aangepast en geoptimaliseerd.

Dierproef

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

- 1) Zijn de LPS gerelateerde bijwerkingen van een [REDACTED] vaccin minder dan van een wole cell vaccin (WCV) omdat tijdens de [REDACTED] extractie al een gedeelte van het LPS is verwijderd of er minder LPS vrij komt in het eindproduct?
- 2) Kunnen de endotoxine-gerelateerde bijwerkingen van een [REDACTED] vaccin middels [REDACTED] en [REDACTED] mutaties van het LPS verminderd worden tot het niveau van de huidige ACV?
- 3) Beïnvloeden deze LPS-mutaties de werkzaamheid/immunogeniteit van het [REDACTED] vaccin door een mogelijke reductie van het adjuverend effect van LPS op de kinkhoestspecifieke afweerresponsen?

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

Er zijn diverse in-vitro analyses beschikbaar, maar deze leveren geen eenduidig resultaat op en hebben daardoor ook weinig tot geen voorspellende waarde voor de bijwerkingen die door experimentele kinkhoest [REDACTED] vaccins worden geïnduceerd. Bovendien dienen voor de registreerbaarheid van een vaccin ook tijdens de ontwikkeling van het product gevalideerde en vereiste testen te worden uitgevoerd. Het ligt voor de hand om voor een [REDACTED] vaccin de richtlijnen voor WCV te volgen. Kinkhoest onschadelijkheidsonderzoek (MWG) wordt voorgeschreven door de Europese Pharmacopee (07/2002:0161 Assay of pertussis vaccine (adsorbed) en door de WHO (requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines, Annex 2, A.3.4.6).

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.

[REDACTED] vaccins bevatten LPS, een endotoxine dat verantwoordelijk is voor een aantal systemische en lokale bijwerkingen. Door het LPS [REDACTED] te detoxificeren kunnen deze bijwerkingen tot een acceptabel niveau worden terug gebracht.

In samenwerking met de Universiteit van [REDACTED] in [REDACTED] onderzoek gedaan naar de werkzaamheid en veiligheid van een kinkhoest [REDACTED] gemaakt van een plasmid-houdende [REDACTED] I stam met [REDACTED] mutatie

[REDACTED]). Dit [REDACTED] vaccin is verkregen middels een DOC-extractie en getest in de Mouse Weight Gain Test (veiligheid) en intranasaal Mouse Challenge Model (bescherming). Deze studie heeft aangetoond dat het [REDACTED] vaccin een beduidend lagere endotoxiciteit heeft zonder dat dit een meetbaar effect heeft op de adjuverende/beschermende werking van het endotoxine (LPS).

Echter, plasmid houdende stammen dienen in aanwezigheid van antibiotica gekweekt te worden en de DOC extractie van [REDACTED] vermindert de productstabiliteit van [REDACTED] vaccins aanzienlijk. Daarnaast is de Tohama I stam een aan het laboratorium geïntroduceerde stam die niet meer representatief is voor de huidige circulerende kinkhoest stammen ([REDACTED]) en een afwijkend groeipatroon in het synthetisch THJIS medium. Onze voorkeur gaat dus uit naar het gebruik van chromosomale mutanten gemaakt van een recente klinische isolaten, waarvan [REDACTED] worden gemaakt [REDACTED]-extractie analoog aan het [REDACTED]-[REDACTED] proces).

Het afgelopen jaar zijn de volgende chromosomale vaccinstammen geconstrueerd: 1) [REDACTED] met [REDACTED] en [REDACTED] mutatie; 2) [REDACTED] met [REDACTED] en [REDACTED] mutatie; 3) [REDACTED] met alleen [REDACTED] mutatie; 4) [REDACTED] met [REDACTED] en [REDACTED] mutatie; 5) [REDACTED] met [REDACTED] en [REDACTED] mutatie en [REDACTED] met alleen [REDACTED] mutatie. Door de [REDACTED] mutatie heeft het kinkhoest LPS 1 vetzuurstaart minder en door de [REDACTED] mutatie bevat het LPS een fosfaatgroep minder. De [REDACTED] mutatie leidt tot een significant verminderde endotoxiciteit (gezuiverd LPS), de [REDACTED] mutatie mogelijk niet omdat muizen in tegenstelling tot mensen ongevoelig zijn voor deze LPS verandering (TLR-4 activatie verloopt bij de mens anders dan bij muizen). Uit het onderzoek naar een WCV met een gereduceerd endotoxine gehalte ([REDACTED]) is gebleken dat voornamelijk het vrije LPS (en niet het membraangebonden LPS) verantwoordelijk is voor de mate van LPS gerelateerde bijwerkingen. Bij WCV komt na productie nog steeds relatief veel LPS vrij in het product, voor [REDACTED] is dit nog niet duidelijk. De [REDACTED] mutatie heeft tot gevolg dat de bacterie het pertactine op de buitenmembraan niet meer kan afsplitsen waardoor het [REDACTED]-gehalte in het vaccin aanzienlijk wordt verhoogd en de bescherming tegen een intranasale infectie met een factor 4 verhoogd is [REDACTED].

Omdat het bijwerkingenprofiel van een vaccin erg belangrijk is voor de acceptatie en registratie van een nieuw vaccin is het noodzakelijk in een vroeg stadium van het project te onderzoeken of [REDACTED] vaccins met een [REDACTED] en/o [REDACTED] mutatie de LPS gerelateerde bijwerkingen tot een acceptabel niveau verlagen (nagenoeg gelijk aan ACV) zonder dat dit de werkzaamheid van het vaccin verlaagd (adjuverend effect van LPS op andere beschermende antigenen) aantast (0-meeting).

De aangepaste Mouse Weight Gain Test ([REDACTED], [REDACTED], [REDACTED]) is hiervoor een zeer bruikbare test waarin zowel de endotoxiciteit, [REDACTED] activiteit en immunogeniteit van vaccins bestudeerd kan worden [REDACTED]. Voor kinkhoest [REDACTED] vaccins is het bijwerkingenprofiel tot nu toe nog onbekend.

Voor een kinkhoest [REDACTED] vaccin is nog geen beschermde dosis bekend. Uit [REDACTED] is duidelijk geworden dat een dosis van [REDACTED] per muis beschermend is tegen een intranasale challenge. Doorgaans wordt in toxiciteitsonderzoek hogere vaccindoses gebruikt ([REDACTED] hoger), daarom is gekozen om elk vaccin met 2 in plaats van 1 vaccindosis te testen. Van elk [REDACTED] vaccin wordt een [REDACTED] muis op toxiciteit en immunogeniteit, zodat ook een regressie analyse mogelijk is.

Bij positief resultaat wordt 1 van de stammen gekozen om het productieproces mee door te ontwikkelen (opschaalbaar en GMP-proof). Aan het eind van het procesontwikkelingstraject zal het concept vaccin nogmaals in de MWG getest worden. Tijdens de procesontwikkeling zullen in-vitro assays zoals de MAT test gebruikt worden.

Wetenschappelijke toetsing proefopzet [REDACTED]

Deze dierproef is wetenschappelijk goed onderbouwd en van belang voor de ontwikkeling van verbeterde kinkhoest vaccins. Toch zijn er nog enkele vragen en/of onduidelijkheden. Hieronder staat een samenvatting van de belangrijkste vragen naar aanleiding van deze dierproef waar o.a. waarom [REDACTED] mutanten in de muis testen als deze niet gevoelig zijn voor deze mutatie, waarom mutanten van 2 verschillen stammen worden getest, waarom er wordt aangenomen dat [REDACTED] minder toxisch zijn dan WCV en waarom er ook naar [REDACTED] toxiciteit wordt gekeken. Hierop is als volgt geantwoord:

Dit experiment wordt beschouwd als een 0-meting omdat nog weinig bekend is over de in-vivo toxiciteit van kinkhoest [REDACTED]. Het is nog onduidelijk of de [REDACTED] en [REDACTED] mutaties invloed hebben op de virulentie van de [REDACTED]. Bovendien is er nog weinig inzicht in de hoeveelheid LPS dat uit het membraan van een [REDACTED] "lekt", zoals het geval is bij whole cell vaccins. Recentelijk is aangetoond [REDACTED] stammen ([REDACTED]) virulenter zijn dan de [REDACTED] stammen [REDACTED], naast het feit dat stam [REDACTED] minder TLR4 activatie induceert dan [REDACTED] is aanleiding om mutanten van beide stammen te testen omdat deze verschillen invloed kunnen hebben op de samenstelling en/of het gehalte van het membraangebonden en vrij LPS en dus de toxiciteit maar ook de immunogeniteit van de verschillende [REDACTED] preparaten kunnen beïnvloeden.

Bovendien zijn er aanwijzingen gekomen dat [REDACTED] minder goed het TLR4 activeert ten opzichte van andere kinkhoeststammen. Dit kan tot gevolg hebben dat [REDACTED] producten minder toxiciteit opwekken dan [REDACTED] producten.

Al met al kan de samenstelling van de [REDACTED] per stam en per mutant verschillen en dus effect hebben op zowel de toxiciteit als immunogeniteit van de [REDACTED] preparaten.

He [REDACTED] wordt meegenomen als referentie preparaat waarmee de herhaalbaarheid en betrouwbaarheid van het experiment kan worden vastgesteld. Is het experiment wel of niet goed verlopen. Van een whole cell suspensie is bekend dat er relatief veel LPS in oplossing komt (binnen enkele minuten) en we weten nog niet of dit ook het geval is bij [REDACTED]. Bovendien is de hoeveelheid biomassa die wordt ingespoten (dus ook de hoeveelheid LPS) veel lager bij [REDACTED] dan bij WCV [REDACTED]. De ingespoten dosis WCV bevat [REDACTED] LPS en de [REDACTED] preparaten [REDACTED]. De [REDACTED] preparaten bevatten relatief meer LPS [REDACTED] dan WCV [REDACTED] maar absoluut per immunisatie 4 tot 15 maal minder LPS, vandaar de verwachting dat [REDACTED] minder bijwerkingen veroorzaakt. Waarschijnlijk een hele geringe hoeveelheid. In principe kan biologisch actief [REDACTED] dat nog niet is uitgescheiden in de vesicles worden ingesloten en dus bijdragen aan een verhoogde leukocytose, dat een specifieke parameter is voor [REDACTED] toxiciteit [REDACTED]. In het geval van [REDACTED] specifieke toxiciteit zijn de in-vivo testen gevoeliger en nauwkeuriger dan de huidige beschikbare in-vitro testen zoals de CHO test.

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.

Productomschrijvingen:

Kh 96/1:



whole cell positieve controle
 experimenteel vaccin
 experimenteel vaccin
 experimenteel vaccin
 experimenteel vaccin
 experimenteel vaccin
 experimenteel vaccin
 acellulair kinkhoestvaccin (neg. contr)
 negatieve controle

ACV

Fysiologisch zout:

Kh 96/1: referentie vaccin (pos controle)

fysiologisch zout: neg controle

[REDACTED] recent klinisch isolaat (2000)
 [REDACTED] oude klinisch isolaat (1950)
 [REDACTED] mutatie: het beschermende antigen [REDACTED] wordt geconserveerd op de [REDACTED] met een verbeterde bescherming als resultaat
 [REDACTED] mutatie: endotoxine mutatie waarbij [REDACTED] van het [REDACTED] is afgesplitst
 [REDACTED] mutatie: endotoxine mutatie waarbij [REDACTED] van het [REDACTED] is afgesplitst

Biotechnische handelingen:

- Controleren of startgewicht van alle muizen tussen de 14 en 17 gram ligt en alle muizen per kooi individueel merken op dag -1
- Per vaccinverdunding worden 5 muizen intraperitoneaal ingespoten met [REDACTED] vaccin [REDACTED] op dag 0. De in te spuiten producten worden voor en na inspuiten gewogen als controle op immunisatieprocedure
- Alle muizen worden op dag 0, 3 en 7 individueel gewogen voor het bepalen van endotoxiciteit (gewichtsafname)
- Na het wegen op dag 7 bij alle muizen 0,2 ml bloed afnemen via orbitapunctie en bloed opvangen in EDTA buisje.
- Na het wegen op dag 28 alle muizen onder narcose individueel verbloeden via orbita punctie en per muis het bloed opvangen in stolbuisje.

Geef aan hoe de resultaten statistisch worden geanalyseerd.

Het geometrisch gemiddelde van gewichtsverlies (dag 1,3 en 7), leucocyten telling (dag 7) en antilichaamresponsen (dag 28) worden per groep vergeleken en significante verschillen worden berekend m.b.v. students Ttest of One-way ANOVA

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

- 1) Op basis van het gewichtsverlies na inspuiten van het te testen product kan de ernst van de LPS-gerelateerde bijwerking ingeschat worden.
- 2) Met behulp van de leukocyten telling in EDTA-bloed, afgenomen op dag 7, kan de mate van [REDACTED] geïnduceerde bijwerkingen worden bepaald
- 3) Door het meten van antilichaamconcentraties in dag 28 sera kan bekeken worden of de LPS-mutaties een positief of negatief effect hebben op de immunogeniteit van het product.

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.

Muizen worden volgens randomisatielijst verdeeld over de kooien op dag -1 en vaccinpreparaten worden gerandomiseerd en onder code aangeleverd

Zijn er nevenfactoren, zoals verschil in huisvesting of verschil in behandelingstijdstippen tussen experimentele- en controle groep(en), die de behandelingseffecten ongewild zouden kunnen verstoren?
 Neen

Welke maatregelen zijn genomen om de aanwezigheid van nevenfactoren te voorkomen? Indien geen

maatregelen zijn genomen, geef aan waarom.

Er is geen aanleiding om te verwachten dat er nevenfactoren invloed op de resultaten zullen hebben.

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

Omdat de resultaten van dit onderzoek in het registratiedossier worden opgenomen is gekozen het door de EP voorgeschreven standaard aantal dieren per vaccingroep ($n=10$) te gebruiken.

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.

WCV en [REDACTED] vaccins bevatten zowel LPS als [REDACTED]. Beide toxines worden verantwoordelijk gehouden voor een aantal systemische en lokale bijwerkingen.

De verwachting is dat het WCV Kh 96/1 de meeste bijwerkingen induceert (grootste gewichtsverlies en hoogste leukocytose). Ook [REDACTED] vaccin bevatten relatief veel LPS en waarschijnlijk een geringe hoeveelheid [REDACTED]. Er is reeds aangetoond dat gezuiverd LPS van [REDACTED] mutant significant minder toxisch zijn, voor [REDACTED] vaccins is dit nog niet aangetoond. De verwachting is dat de toxiciteit van [REDACTED] tussen het WCV and ACV in ligt, omdat [REDACTED] anders van samenstelling zijn dan WCVs. De [REDACTED] mutatie heeft naar alle waarschijnlijkheid geen effect op het lichaamsgewicht van de muizen, de [REDACTED] mutatie aantoonbaar wel. De verwachting is dat de [REDACTED], [REDACTED], [REDACTED] preparaten significant minder gewichtsafname veroorzaken op dag 1 (en mogelijk ook op dag 3) ten opzichte van de [REDACTED] preparaten omdat de [REDACTED] wel en de [REDACTED] mutatie geen effect heeft op de TRL-4 activatie in de muis, dit in tegenstelling tot de mens. Het ACV bevat nauwelijks of geen LPS en zal dus nauwelijks of geen gewichtsverlies laten zien, gelijk aan de fys.zout controle.

De leukocytose op dag 7 is een maat voor [REDACTED] activiteit. Alle [REDACTED] producten hebben waarschijnlijk eenzelfde beperkte verhoging van het aantal leukocyten in het bloed op dag 7. Indien de [REDACTED] toxiciteit als te hoog wordt beoordeeld kan worden besloten of het noodzakelijk is ook het [REDACTED] genetisch te detoxificeren. Het ACV zal nauwelijks of geen verhoging in WBC laten zien omdat dit [REDACTED] gedetoxificeerd is.

De antilichaamtiter in dag 28 sera zullen voor alle producten gelijk zijn, zodat daadwerkelijk is bewezen dat de LPS mutaties geen effect hebben op de immunogeniteit van de [REDACTED] vaccins.

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.

Voor het ontwikkelen van een kinkhoest [REDACTED] vaccin met genetisch gedetoxificeerd LPS is het van belang in een vroeg stadium te weten of de eventuele bijwerkingen die het [REDACTED] vaccin kan opwekken op een acceptabele niveau zijn. Met dit experiment wordt onderzocht of deze [REDACTED] vaccins daadwerkelijk minder toxisch zijn dan [REDACTED] vaccins dat nog wildtype LPS bevat. Daarnaast wordt gekeken of deze LPS mutaties geen negatief effect hebben op de immuunrespons door een verminderde adjuvantwerking van LPS op andere beschermende antigenen.

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

geen

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

geen

UITVOERING

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

Onderzoeksnummer: **MWG 13-01**

Producten

groep.	Naam product	muisnr.	aantal	ml
1	Kh 96/1 referentie (WCV pos contr)	01-05	5	
2	Kh 96/1 referentie (WCV pos contr)	06-10	5	
3	XXXXXXXXXX 1	11-15	5	
4	XXXXXXXXXX 1	16-20	5	
5	XXXXXXXXXX 2	21-25	5	
6	XXXXXXXXXX 2	26-30	5	
7	XXXXXXXXXX 3	31-35	5	
8	XXXXXXXXXX 3	36-40	5	
9	XXXXXXXXXX 4	41-45	5	
10	XXXXXXXXXX 4	46-50	5	
11	XXXXXXXXXX 5	51-55	5	
12	XXXXXXXXXX 5	56-60	5	
13	XXXXXXXXXX 6	61-65	5	
14	XXXXXXXXXX 6	61-70	5	
15	ACV (neg contr)	71-75	5	
16	Fys. zout (neg contr)	76-80	5	

producten worden gerandomiseerd over de kooien en onder groepscode aangeleverd

Aantal muizen:

5 muizen per vaccinverdunding, per XXXXXXXXXX vaccin 2 vaccindoses (XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX muis), Kh96/1 (100 IU/ml) en ACV (XXXXXXXXXX hum doses) 1 verdunding.

Geslacht:

mannen

Handelingen:

Datum	Handelingen
Dag -1	Muizen volgens randomisatielijst verdelen over de groepen muizen individueel merken Muizen individueel wegen op juiste gewicht (14-17 gram) en kleuren.
Dag 0	Muizen individueel wegen en om ca. 16:00 uur inspuiten (0.5 ml, intraperitoneaal) volgens immunisatieformulier
Dag 1 (16 uur na inspuiten)	Om ca. 08:00 uur (16 uur na immunisatie) muizen individueel wegen en controleren op ziekteverschijnselen.
Dag 3	Muizen individueel wegen en controleren op ziekteverschijnselen.
Dag 7	Muizen individueel wegen en controleren op ziekteverschijnselen. Muizen individueel bloed afnemen via orbitapunctie en 0.2 ml opvangen in EDTA buisje.
Dag 28	Muizen verbloeden via oog onder narcose ($\pm$ 0.5 tot 1 ml)

Opmerkingen:Verstrekking aan de dieren:

Voer:

Soort voer:	Soort voer:
Productiedatum:	Productiedatum:
Expiratiedatum:	Expiratiedatum:

Zaagsel: Bestraald, Type 10/20

Datum in gebruik:

Datum in gebruik:

Batchnummer:	Batchnummer:
--------------	--------------

Kooiverrijking

Soort:

Soort:

Batch nummer:	Batch nummer:
Datum in gebruik:	Datum in gebruik:

Naam verantwoordelijke functionaris:

Paraaf:

Datum:

WTC (Wetenschappelijke Toetsing Commissie)

Discussie wetenschappelijke toetsing:

Onderzoek wordt uitgevoerd in het kader van regelgeving en conform beschreven EP en wordt intern wetenschappelijk getoets door [REDACTED] of [REDACTED]

DIEREN

Diersoort: muis

Stam	RivmN:NIH			
Geslacht	Mannelijk			
Aantal	80			
Leeftijdswaarde (weken)				
Gewichtswaarde (grammen)	14-17 gr.			
Microb. status	spf			
Herkomst	Gebouw [REDACTED]			
Locatie	[REDACTED]			
Kooitype	macrolon III			

Geslacht**Wanneer u voor één geslacht kiest, graag motiveren waarom voor dit geslacht is gekozen?**

Het gewicht is een belangrijke parameter in dit experiment. Mannen en vrouwen verschillen te veel in lichaamsgewicht en bij mannen kan een groter verschil in gewichtsverlies worden gemeten waardoor de nauwkeurigheid van de test beter wordt.

Speciale wensen t.a.v. de proefdieren:

alleen mannen s.v.p., bij binnenkomst gewicht tussen 13 en 16 gram

MKB (Microbiologisch kwaliteitsbeheer)**Herkomst:**

Zijn de dieren herkomstig uit een ander dierproef?: Nee

Verplaatsing:

Worden de dieren tijdens de dierproef verplaatst naar een andere locatie?: Nee

Micro-organismen:

Worden in het kader van de dierproef micro-organismen ingebracht?: Nee

Biologisch materiaal:

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

Wat voor een materiaal (+ event. code)?: experimentele XXXXXXXXXX vaccins en referentie vaccins: Kh 96/1 en ACV

Bijzonderheden t.b.v.MKB:

Onderzoek wordt uitgevoerd als combinatie van MWG en LP test (MTI)

AGENTIA

Stofnaam	Chemisch/Biologisch materiaal?	Klassificatie
WCV	Biologisch	geen
ACV	Biologisch	geen
XXXXXXXXXX	Biologisch	geen

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

werken volgens vmt

2. Vindt er uitscheiding plaats via urine, faeces, longen, bloed of haar?Nee**3. Welke maatregelen moeten er genomen worden bij besmetting huid, ogen of prikaccident?**

nvt

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

afspoelen met alcohol

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

afvoer via rvs vaten

WELZIJN**Beschrijf en kwantificeer de aard van het ongerief**

Wanneer men het ongerief niet goed kan inschatten, raadpleeg de proefdierdeskundige

Ongerief per (bio)technische handeling incl. de gevolgen daar van

Handeling	Aard van het ongerief	Mate ongerief	Duur ongerief	Kans ongerief
intraperitoneale immunisatie	pijn	gering-matig	enkele minuten	100%
bloedafname	pijn	gering-matig	enkele minuten	100%
verbloeden	pijn	gering-matig	enkele minuten	100%

Ongerief door andere omstandigheden dan strikt de experimentele handelingen

Omstandigheid	Aard van het ongerief	Mate ongerief	Duur ongerief	Kans ongerief

Gecumuleerd risico op ongerief voor het hele experiment / per experimentele groep

alle dieren worden 1x geïmmuniseerd, 1x bloed afgenomen en einde proef verbloed	100%
---	------

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	isofluraan in O2	voor	bloedafname via oog
2	isofluraan in O2	voor	verbloeden einde proef
3		voor	
4		voor	
5		voor	

Analgesie:

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

Gebruikt u een analgeticum?: Nee

U geeft aan dat de dieren als gevolg van de dierproef pijn zullen ondervinden, maar u wenst geen gebruik te maken van een analgeticum.

Motiveer uw keuze.

geen aanleiding en een analgeticum kan de afweerrespons onderdrukken en daardoor het experiment beïnvloeden

Kooiverrijking:

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

Individuele huisvesting:

Moeten de dieren individueel gehuisvest worden? Nee

Klinische Effecten:

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

geen

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

niet van toepassing

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 : isofluraan in O2

Bijzonderheden:

Bijzonderheden t.b.v. art. 14

Onderzoek wordt uitgevoerd als Mouse Toxicity & Immunogenicity (MTI) test (combinatie MWG en LP test). Op dag 28 worden de dieren verbloed om een indruk te krijgen van de te verwachten potency.

3 V's

Geef aan waarom deze vraag dient te worden beantwoord met behulp van een dierproef en een dierproef-vrije aanpak niet mogelijk is.

Er zijn diverse in-vitro analyses beschikbaar, maar deze leveren geen eenduidig resultaat op en hebben daardoor ook weinig tot geen voorspellende waarde voor de bijwerkingen die door experimentele kinkhoest XXXXXXXXXX vaccins worden geïnduceerd. Bovendien dienen voor de registreerbaarheid van een vaccin ook tijdens de ontwikkeling van het product gevalideerde en vereiste testen te worden uitgevoerd. Het ligt voor de hand om voor een XXXXXXXXXX vaccin de richtlijnen voor WCV te volgen. Kinkhoest onschadelijkheidsonderzoek (MWG) wordt voorgeschreven door de Europese Pharmacopee (07/2002:0161 Assay of pertussis vaccine (adsorbed) en door de WHO (requirements for diphtheria, tetanus, pertussis and combined vaccines, Annex 2, A.3.4.6).

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?

n.v.t.

CODERING

- Bijzonderheid dier:** 1. Gewoon dier
Herkomst en hergebruik dieren: 1. Gereg.fok/toelevering in Nederland
Doel van de proef: 2. Mens-prod./contr./ijking sera vaccins/biol. product.
Belang van de proef: 1. Gezondheid/Voed. Ja
Wettelijke bepalingen: 4. Uitsluitend Lid-Staten Raad v.Europa
Toxicologisch onderzoek, incl. veiligheidsonderzoek: 11. Overig toxiciteits onderzoek
Bijzondere technieken: 1. Geen van deze technieken
Anesthesie: 4. Is wel toegepast
Pijnbestrijding, postoperatief of op ander tijdstip: 1. Is niet toegepast (geen aanleiding)
Mate van ongerief: 1. Gering

Aantal Dieren:	Mate van ongerief:

- Toestand dier na eind proef:** 2. Gedood na beëindiging van de proef

BIJLAGEN

ADDENDUM

AUTORISATIE HISTORIE

(24-4-2013 13:53:19) Goedgekeurd door Artikel 12 functionaris [REDACTED]

(13-5-2013 10:47:22) Goedgekeurd door Artikel 9 functionaris [REDACTED]

(14-5-2013 10:40:12) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]

(6/5/2013 2:47:16 PM) Goedgekeurd door A14 functionaris [REDACTED]

(6-6-2013 17:47:55) Positief advies gegeven door DEC functionaris [REDACTED]

(11-6-2013 14:28:07) Goedgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED]

AUTORISATIE**Verantwoordelijke Art 12 functionaris:**

[REDACTED]
(24-4-2013 13:53:19) Goedgekeurd door Artikel 12 functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:**Verantwoordelijke onderzoeker (Art. 9)**

Naam: [REDACTED]

Vervanger: [REDACTED]

(13-5-2013 10:47:22) Goedgekeurd door Artikel 9 functionaris [REDACTED]

WTC Autorisatoren:**Opmerkingen:****Offerte Autorisatoren:**

[REDACTED]
(11-6-2013 14:28:07) Goedgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED]

Bestelnummer:

Opmerkingen:**MKB Autorisatoren:**

(14-5-2013 10:40:12) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:**BVF Autorisatoren:**

[REDACTED]

Opmerkingen:**Art. 14 Autorisatoren:**

(6/5/2013 2:47:16 PM) Goedgekeurd door A14 functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

DEC Autorisatoren:

(6-6-2013 17:47:55) Positief advies gegeven door DEC functionaris [REDACTED]

Opmerkingen:

©Intravacc 2014 Alle rechten voorbehouden