

<b>Proefopzet</b>	██████████	<b>Auteur:</b>	██████████
<b>Creatie:</b>	08-02-2013	<b>Laatste wijziging:</b>	15-05-2013
<b>Status proefopzet:</b>	Goedgekeurd	<b>Status experiment:</b>	Afgesloten

**ALGEMEEN****Project****Projectnummer:****Project titel:****Projectleider(s):****Startdatum project:**██████████  
01-01-2013**Dierproef****Titel dierproef:**

Delivery concept van peptide-geladen influenza virosomen

**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:**

1-120

**Duur dierproef:**

56 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.**

Seizoenale influenza A infecties vormen een belangrijke oorzaak van ziekte en overlijden binnen de Nederlandse samenleving. Daarnaast is er de dreiging van een uitbraak van een pandemisch griepvirus wat geheel nieuw is voor de mens zoals in het verleden meerdere malen gebeurd is (o.a. de Spaanse griep van 1918, Mexicaanse griep van 2009). Traditionele griepvaccins bieden voornamelijk bescherming door de inductie van griep-specifieke antilichamen. Deze antilichamen zijn nauwelijks in staat tot kruisbescherming tegen nieuwe griepvarianten. Deze kruisbescherming zou verbeterd kunnen worden door de introductie van een T cel component, zowel gezien het beschermende effect van griep-specifieke T cellen in diermodellen als het feit dat de virus-epitopen die door T cellen herkend worden in hoge mate geconserveerd zijn tussen verschillende virusstammen.

In de huidige vaccins worden deze griep-specifieke T cellen bijzonder inefficiënt geïnduceerd en daarom zou een T cel-component in samenhang met klassieke vaccin-componenten bredere bescherming kunnen bieden tegen epidemieën en nieuwe pandemieën.

In dit consortium willen wij een innovatief influenza A vaccin ontwikkelen door gebruik te maken van een technologie die al is ontwikkeld door consortiumpartners. Deze technologie maakt het mogelijk om T cel responsen zichtbaar te maken, waardoor een databank van griep-specifieke T cel epitopen ontwikkeld kan worden. Deze databank wordt gebruikt voor de ontwikkeling van een volledig synthetische T cel epitopen (peptiden), die moeten leiden tot een T cel gebaseerd influenza vaccin dat bescherming moet bieden tegen toekomstige pandemieën.

De specifieke T-cel epitopen die binnen het consortium ontwikkeld zijn, zijn momenteel alleen in staat een immuunrespons op te wekken in combinatie met adjuvantia die niet geschikt zijn voor menselijk gebruik (bijv. incompleet Freund's adjuvant - [REDACTED]). Er zijn dus nieuwe formuleringen (delivery systems en adjuvantia) nodig om het peptide effectief en veilig toe te dienen.

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

Het ontwikkelen van peptide-gebaseerde vaccinatie strategieën ter preventie van influenza A besmetting.

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

Ontwikkeling van een nieuw influenza A vaccin, dat een bredere bescherming biedt dan huidige vaccins.

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

Onderzoeken in hoeverre een T cel component kan bijdragen aan (kruis)bescherming, en welke rol een delivery systeem daarbij speelt.

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

Zijn actieve virosomen nodig om een T-cel respons tegen het peptide op te wekken, en moet het peptide geladen zijn in de virosomen of is mixen voldoende?

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

In deze proef worden de immunogeniciteit en effectiviteit van verschillende virosom-adjuvant combinaties bestudeerd. Momenteel zijn er geen goede in vitro modellen om alle aspecten van de immuunrespons te bestuderen. Er is gekozen voor een muismodel omdat er met dit model naast fretten de meeste kennis is over influenza infecties en vaccinaties. In het [REDACTED] project worden peptiden voor humaan HLA-A2. Aangezien het peptide vaccin alleen gebonden kan worden door humane HLA-A2 moleculen, zijn er HLA-A2 transgene muizen nodig in dit experiment.

**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.**

Met de huidige vraagstelling willen we verifiëren of ons delivery concept (T-cel specifieke peptiden laden in virosomen) wel juist is. De resultaten van het vorige dierexperiment [REDACTED] lieten zien dat peptide-geladen virosomen in combinatie met adjuvant CpG erg goede T-cel responsen opwekten (gelijk / hoger dan de twee positieve controles; peptide+incompleet friends adjuvant+CpG en een sublethale influenza infectie). Echter, een mix van ongeladen virosomen met los peptide liet ook een respons zien, alhoewel deze lager was dan de peptide-geladen virosomen + CpG. Met deze huidige dierproef willen we definitief vaststellen of virosom belading met peptide nodig is, of mixen voldoende is; de procedure om virosomen te laden met peptide is namelijk ingewikkelder dan simpel mixen. Tevens is [REDACTED] een mogelijke vervanging voor virosomen als mixen voldoende is. Als laatste willen we onderzoeken of verhoogde T-cel responsen tegen het

peptide daadwerkelijk zorgt voor protectie tegen een influenza infectie.

**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.**

Groups:

Immunization studie

1. PBS
2. [REDACTED] challenge
3. [REDACTED] ug GILG + CpG
4. [REDACTED] ug GILG + CpG
5. [REDACTED] ug GILG + IFA + CpG
6. [REDACTED] ug GILG + IFA + CpG
7. [REDACTED] ug GILG-loaded virosomes + CpG
8. [REDACTED] ug Inactivated GILG-loaded virosomes + CpG
9. [REDACTED] ug GILG + virosomes + CpG
10. [REDACTED] ug GILG + virosomes + CpG
11. [REDACTED]
12. [REDACTED]
13. [REDACTED]

Beschermings studie

14. PBS
15. [REDACTED] challenge
16. [REDACTED] ug GILG + CpG
17. [REDACTED] ug GILG + IFA + CpG
18. [REDACTED] ug GILG-loaded virosomes + CpG
19. [REDACTED] ug GILG + virosomes + CpG
20. [REDACTED]

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

De resultaten zullen worden geanalyseerd d.m.v. een t-test of een ANOVA. Deze testen bleken goed toepasbaar te zijn op soortgelijke data in een voorgaand experiment [REDACTED]

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

Het experiment is in twee onderdelen verdeeld; de immunisatie studie waar gekeken wordt naar de immunologische respons na vaccinatie, en de challenge studie waar gekeken wordt of de vaccinaties daadwerkelijk beschermen tegen influenza infectie.

Groepen 1 t/m 6 omvatten de positieve en negatieve controles, die al deels eerder uitgevoerd zijn in [REDACTED]. Groep 3 en 4 zijn additionele controles om het effect van IFA te controleren (verwacht wordt dat zonder IFA er geen effect optreed). Groep 7 en 8 zullen beantwoorden of de virosomen daadwerkelijk fusie-actief moeten zijn voor hun effect, of dat ze ook in geïnactiveerde vorm nog steeds effect hebben. Groep 9 zal beantwoorden of simpel mixen genoeg is om T-cel responsen op te wekken, of dat inbouw van het peptide (GILG) in virosomen (groep 7) daadwerkelijk nodig is. Groep 10 bevat een verhoogde peptide dosis, wat de responsen wellicht kan verhogen. Uit groep 11 t/m 13 zal blijken of we echt virosomen nodig hebben, of dat [REDACTED] al voldoende is.

Groep 14 t/m 20 zijn grotendeels dezelfde groepen uit het eerste deel, alleen zullen deze muizen gechallenged worden met een sublethale dosis influenza virus. Na analyse van de gewichtscurves zal blijken welke formulatie we nodig hebben voor uiteindelijke bescherming; uit de data van de immunisatie studie kunnen we vervolgens direct de immunologische respons correleren aan reductie van gewichtsverlies.

**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.**

De dieren worden willekeurig onder de groepen verdeeld. Alle groepen zullen zoveel mogelijk dezelfde behandelingen ondergaan.

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

**Welke maatregelen zijn genomen om de aanwezigheid van nevenfactoren te voorkomen? Indien geen maatregelen zijn genomen, geef aan waarom.**  
Zoveel mogelijk gelijke behandeling en huisvesting.

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

Voor de immunisatie studie: Poweranalyse geeft 6 dieren per groep ( $\alpha=0.05$  and  $\text{power}=0.90$ ; geanticiperde variatie coefficient=10 (Student's t-test), met een effectgrootte van 25%. Resultaten van vorig experiment (██████████) die dezelfde readout gebruikte, liet zien dat er significante verschillen aan te tonen waren met deze groepsgrootte. Voor de beschermings studie: Poweranalyse geeft 6 dieren per groep ( $\alpha=0.05$  and  $\text{power}=0.90$ ; geanticiperde variatie coefficient=10 (Student's t-test), met een effectgrootte van 25%.

**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.**

Met deze dierproef willen wij meerdere vragen beantwoorden over de werking van onze peptide-virosoom formulaties. Ten eerste zijn er de mechanistische vraagstukken: Werken de virosomen door middel van fusie activiteit of niet, en is het nodig om het peptide te laden in virosomen of is mixen al voldoende? Deze twee vragen zullen direct beantwoord worden door naar de geïnduceerde T-cel responsen te kijken na vaccinatie (groepen 7 t/m 10). Uit de laatste vraag vloeit ook de hypothese voort dat ██████████ ook al voldoende zou kunnen zijn in plaats van virosomen (groep 11 t/m 13). De tweede belangrijke vraag is of de vaccins daadwerkelijk een protectieve immuunrespons kunnen opwekken. Aangezien er nog geen data beschikbaar is over een correlatie tussen T-cel responsen en protectie, is dit wetenschappelijk een zeer interessante vraag. De groepen die zullen worden getest bevatten postieve en negatieve controles (groep 14 en 15); en een aantal vaccin formulaties waarvan verwacht wordt dat ze de hoogste T-cel responsen zouden kunnen opwekken.

**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.**

Binnen het ██████████-project willen wij een innovatief influenza A vaccin ontwikkelen dat naast de klassieke vaccin-componenten ook een T cel component bevat. In de voorgaande studie is bewezen dat virosomen de peptide-specifieke T-cel responsen significant verhogen (██████████). In deze dierproef willen wij de mechanismen waarmee virosomen peptide-specifieke T-cel responsen opwekt nader bestuderen. Tevens willen we onderzoeken of T-cel responsen genoeg zijn om cross protectie te geven tegen een influenza infectie.

**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.

**Groepsindeling**

Immunisatie deel:

Groep	Subgroep	# muizen	Nrs	Vaccinatie
1	A	3	1-3	PBS
	B	3	4-6	
2	A	3	7-9	Influenza virus challenge ([REDACTED])
	B	3	10-12	
3	A	3	13-15	[REDACTED] ug GILG + CpG
	B	3	16-18	
4	A	3	19-21	[REDACTED] ug GILG + CpG
	B	3	22-24	
5	A	3	25-27	[REDACTED] ug GILG + IFA + CpG
	B	3	28-30	
6	A	3	31-33	[REDACTED] ug GILG + IFA + CpG
	B	3	34-36	
7	A	3	37-39	[REDACTED] ug GILG-loaded virosomes + CpG
	B	3	40-42	
8	A	3	43-45	[REDACTED] ug Inactivated GILG-loaded virosomes + CpG
	B	3	46-48	
9	A	3	49-51	[REDACTED] ug GILG + virosomes + CpG
	B	3	52-54	
10	A	3	55-57	[REDACTED] ug GILG + virosomes + CpG
	B	3	58-60	
11	A	3	61-63	[REDACTED]
	B	3	64-66	
12	A	3	67-69	[REDACTED]
	B	3	70-72	
13	A	3	73-75	[REDACTED]
	B	3	76-78	
	Totaal	78		

Beschermings deel:

Groep	Subgroep	# muizen	Nrs	Vaccinatie
14	A	3	79-81	PBS
	B	3	82-84	
15	A	3	85-87	Influenza virus challenge ([REDACTED])

	B	3	88-90	
16	A	3	91-93	██████ ug GILG + IFA + CpG
	B	3	94-96	
17	A	3	97-99	██████ ug GILG + IFA + CpG
	B	3	100-102	
18	A	3	103-105	██████ ug GILG-loaded virosomes + CpG
	B	3	106-108	
19	A	3	109-111	██████ ug GILG + virosomes + CpG
	B	3	112-114	
20	A	3	115-117	████████████████████
	B	3	118-120	
	Totaal	42		

### Experimentele procedure:

Procedure is onderverdeeld in 2 subgroepen; subgroep A en B. Subgroep B wordt 7 dagen na subgroep A ingezet (zie schema).

**Dag 0:** Alle dieren worden individueel gemarkeerd. Alle muizen worden s.c. gevaccineerd met 100  $\mu$ l (0.1 ml) van bovenstaande vaccin formulaties in de rechterflank of intranasaal met virus challenge (groep 2 en 15) (50  $\mu$ l; ██████ PFU; onder anesthesie met O<sub>2</sub> en isofluraan). Dieren van groep 2 en 15 worden gewogen.

**Dag 21:** Van alle muizen wordt onder complete anesthesie met O<sub>2</sub> en isofluraan bloed afgenomen door middel van een orbitapunctie, bloed wordt opgevangen in een stolbuis (100-150  $\mu$ l). Tevens worden de dieren nogmaals s.c. gevaccineerd met 100  $\mu$ l (0.1 ml) boostervaccin in de linkerflank of intranasaal met virus challenge (groep 2 en 15) (50  $\mu$ l; ██████ PFU; onder anesthesie met O<sub>2</sub> en isofluraan). Dieren van groep 2 en 15 worden gewogen.

### Dag 35:

**Immunologisch deel (groep 1 t/m 13):** De dieren worden opgeofferd onder isofluraan anesthesie door middel van verbloeding. Het bloed wordt opgevangen in stolbuizen. De milt wordt van elke muis geïsoleerd, opgenomen in medium en bewaard op ijs.

**Beschermingsdeel (groep 14 t/m 20):** De dieren worden intranasaal gechallengeerd met 50  $\mu$ l ██████ ██████ influenza virus onder anesthesie met O<sub>2</sub> en isofluraan.

Vanaf dit moment (dag 35) worden alle muizen van groep 14 t/m 20 dagelijks gewogen en 2x per dag gescored ('s ochtends en 's middags) op klinische kenmerken en deze gegevens worden op standaard scoringslijsten vastgelegd.

Muizen met score 3 worden extra goed in de gaten gehouden. Het humane eindpunt van de proef voor een muis is score 4 d.w.z. opstaande vacht, inactief dier, meer dan 20% gewichtsverlies, voelt koud aan. Gelieve voordat overgegaan wordt tot euthanasie contact op te nemen met de verantwoordelijk onderzoeker ██████████. Indien geen contact mogelijk blijkt, mag de verzorger bij bovengenoemde symptomen tot euthanasie van het dier besluiten.

Zieke dieren worden verbloed onder algehele anesthesie. Bloed wordt opgevangen in stolbuis.

### Ziektescore:

Scor	Ziekteverschijnselen

e	
0	Geen aanwijzingen voor ziekte
1	Opstaande vacht
2	Opstaande vacht, inactief dier
3	Opstaande vacht, inactief dier, gewichtsverlies
4	Opstaande vacht, inactief dier, meer dan 20% gewichtsverlies, voelt koud aan
5	Dood

**Dag 49:** De dieren van groep 14 t/m 20 worden opgeofferd onder isofluraan anesthesie door middel van verbloeding. Het bloed wordt opgevangen in stolbuizen.

#### Werkschema (Subgroep B start 1 week na subgroep A)

Dag	
0	Vaccinatie
21	Booster + bloedafname
35	Opoffering / milt / bloed (groep 1 t/m 13)  Virus challenge (groep 14 t/m 20)
49	Opoffering / bloedafname (groep 14 t/m 20)

#### Analysetechnieken

**ELISA** - Antibody productie in serum (Total IgG, IgG1/IgG2a)

**ELISPOT** - Cytokine productie in miltcellen (IFN- $\gamma$ , IL-4)

**FACS** - Active/functional CD8+ T-cellen na herstimulatie met peptide en/of PR8 virus in miltcellen (CD8+/IFN- $\gamma$ )



**WTC (Wetenschappelijke Toetsing Commissie)**

**Discussie wetenschappelijke toetsing:**

**DIEREN**

Diersoort: muis-genetisch gemodificeerd

<b>Stam</b>	HLA-AZ/B6			
<b>Genotype</b>	+/-			
<b>GGO vergunning nummer</b>	██████████			
<b>Inperkings niveau volgens regelingen besluit GGO</b>	D-I			
<b>Verantwoordelijk Medewerker GGO vergunning</b>	██████████			
<b>Geslacht</b>	Vrouwelijk			
<b>Aantal</b>	120			
<b>Fokoverschot</b>	anders, nl			
<b>nl. (aantal dieren)</b>	360			
<b>Leeftijdswaarde (weken)</b>	6-8 weken			
<b>Gewichtswaarde (grammen)</b>				
<b>Microb. status</b>	spf			
<b>Herkomst</b>	██████████			
<b>Locatie</b>	████			
<b>Kooitype</b>	filtertop, macrolon II			

**Geslacht**

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

Meerdere mannelijke muizen in een kooi resulteert meestal in vechten wat verwondingen bij de dieren kan opleveren. Vrouwelijke muizen kunnen met meerdere in een kooi, wat praktisch beter uitvoerbaar is.

**Genetisch gemodificeerde dieren:**

Indien

(a) gewerkt wordt met een in Nederland vervaardigde genetisch gemodificeerde stam en

(b) deze stam voor de eerste maal op het Intravacc voor onderzoek gebruikt wordt, dan wordt u verzocht het volgende aan te geven:

**1. De plaats van herkomst van de genetisch gemodificeerde stam.**

**2. Hebben de genetisch gemodificeerde dieren afwijkingen die het welzijn van de dieren aantasten? Zo ja, welke afwijkingen?**

Daarnaast dient u kopieën van relevante aspecten uit het welzijnsdagboek of de betreffende database naar de art 14 functionaris van het Intravacc toe te zenden.

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

**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?: Ja

Volledige naam micro-organisme?: Influenza A ██████████

Levend of gedood micro-organisme?: Levend

Klasse biologische agentia volgens ARBO besluit 2005: Klasse 2

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

**Biologisch materiaal:**

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

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

Stofnaam	Chemisch/Biologisch materiaal?	Klassificatie
Virosomen ██████████	Biologisch	biologisch materiaal
Peptiden en adjuvantia	Chemisch	geen
Influenza ██████████	Biologisch	risico klasse 2

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

De challenge met influenza dient in een BioSafety kabinet te worden ingezet.

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

Zo ja, via wat en hoelang?(dagen) Virus wordt gedurende 5-7 via de longen uitgescheiden.

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

Bij blootstelling oog uitspoelen en bij prikaccident desinfecteren en bij beiden bedrijfsarts waarschuwen. Werken met handschoenen en besmette huid wassen. Medewerkers moeten zijn gevaccineerd met de grieprik.

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

Desinfecteren met 70% ethanol en vervolgens autoclaveren waar mogelijk.

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

Autoclaveren en afvoeren.

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

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

<b>Ongerief per (bio)technische handeling incl. de gevolgen daar van</b>				
<b>Handeling</b>	<b>Aard van het ongerief</b>	<b>Mate ongerief</b>	<b>Duur ongerief</b>	<b>Kans ongerief</b>
Vaccinatie	Injectie	Gering/matig	< 2 min.	100%
Orbitapunctie	Bloedafname onder alg. anesthesie	Gering/matig	< 5 min.	100%
Intranasale challenge met influenza A	Infectie kan leiden tot verminderd eten/drinken en ernstig gewichtsverlies.	Groep 2, gering/matig	< 10 dagen	100%
		Groep 14 t/m 20: matig/ernstig	< 10 dagen	100%
Wegen	Hanteren dieren	Groep 14 t/m 20: gering	1x per dag	100%
	Verbloeden onder alg. anesthesie	Gering	< 5 min.	100%
Euthanasie				

<b>Ongerief door andere omstandigheden dan strikt de experimentele handelingen</b>				
<b>Omstandigheid</b>	<b>Aard van het ongerief</b>	<b>Mate ongerief</b>	<b>Duur ongerief</b>	<b>Kans ongerief</b>
Geen				

<b>Gecumuleerd risico op ongerief voor het hele experiment / per experimentele groep</b>	
Groep 1 t/m 13	Gering/matig
Groep 14 t/m 20	Matig/ernstig

**Anesthesie:**

Worden de dieren tijdens de dierproef onder anesthesie gebracht?

Ja

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

	<b>Anesthesie keuze</b>		<b>Handeling(en)</b>
1	sofluraan in O2	voor	Challenge/vaccinatie
2	sofluraan in O2	voor	Orbitapunctie
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.

Onverenigbaar met proef. Met het gedrag van de dieren wordt namelijk o.a. de ziektescore, en op grond daarvan, het humane eindpunt bepaald. Bij toediening van pijnbestrijding kunnen de dieren zieker zijn dan op basis van hun gedrag wordt uitgelezen.

**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.):**

Muizen die geïnfecteerd zijn met hoog infectief influenza zullen binnen 48-96 uur verminderde activiteit vertonen, minder gaan eten en drinken, zullen niet meer aankomen of zelfs gewicht gaan verliezen. Ook zullen ze de rug optrekken en juist bij elkaar gaan kruipen of zich afzonderen met een verhoogde ademhalingsfrequentie en opstaande vacht. Muizen vertonen juist een verlaging van de lichaamstemperatuur i.p.v. koorts en krijgen geen neusuitvloeiing.

Muizen moeten 2x per dag gecontroleerd worden ('s ochtends en 's middags) en gescoord worden op ziektekenmerken.

0 = geen aanwijzingen voor ziekte

1 = opstaande vacht

2 = opstaande vacht, inactief dier

3 = opstaande vacht, inactief dier, gewichtsverlies

4 = opstaande vacht, inactief dier, meer dan 20% gewichtsverlies, voelt koud aan

5 = dood

**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 : isofluraan in O2**

**Bijzonderheden:**

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

**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.**

In deze proef worden de immunogeniciteit en effectiviteit van verschillende virosoom-adjuvant combinaties bestudeerd. Momenteel zijn er geen goede in vitro modellen om alle aspecten van de immuunrespons te bestuderen. Er is gekozen voor een muismodel omdat er met dit model naast fretten de meeste kennis is over influenza infecties en vaccinaties. In het [REDACTED] project worden peptiden voor humaan HLA-A2. Aangezien het peptide vaccin alleen gebonden kan worden door humane HLA-A2 moleculen, zijn er HLA-A2 transgene muizen nodig in dit experiment.

**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?**

Er is een poweranalyse uitgevoerd om de grootte van de groepen te bepalen, waardoor er niet onnodig te veel of te weinig dieren worden gebruikt. Ter verfijning wordt er anesthetica gebruikt tijdens de bloedafname, wat het ongerief van de dieren minimaliseert.

**CODERING**

<b>Bijzonderheid dier:</b>	2. Genetisch gemodificeerd dier
<b>Herkomst en hergebruik dieren:</b>	1. Gereg.fok/toelevering in Nederland
<b>Doel van de proef:</b>	1. Mens-ontw. sera vacc./biol.product
<b>Belang van de proef:</b>	1. Gezondheid/Voed. Ja
<b>Wettelijke bepalingen:</b>	1. Geen wettelijke bepalingen
<b>Toxicologisch onderzoek, incl. veiligheidsonderzoek:</b>	1. Geen toxicologisch onderzoek
<b>Bijzondere technieken:</b>	1. Geen van deze technieken
<b>Anesthesie:</b>	4. Is wel toegepast
<b>Pijnbestrijding, postoperatief of op ander tijdstip:</b>	2. Is niet toegepast (onverenigbaar proef)
<b>Mate van ongerief:</b>	

Aantal Dieren:	Mate van ongerief:
78	2. Gering/ matig
42	4. Matig/ ernstig

**Toestand dier na eind proef:** 1. Dood in de proef/dood na de proef

**BIJLAGEN**



**ADDENDUM**

(8/1/2013 10:36:00 AM) Addendum toegevoegd door [REDACTED]

Reden wijziging: Anders nl.

Omschrijving wijziging: We willen graag deel B van het immunisatiedeel van de proef overnieuw uitvoeren. Een van de belangrijke analyses (uitlezen van T-cel responsen) is voor dit gedeelte mislukt, waardoor we op dit vlak alleen data van deel A van het experiment hebben. Uit deel A hebben we echter wel geconcludeerd dat een paar van onze controlegroepen geen T-cel reacties opwekken naar verwachting. Aangezien deze groepen niet essentieel waren voor de uitkomst van dit experiment, stellen we voor om deze groepen te excluderen in de herhaling van deel B, wat tot vermindering van het aantal dieren leidt.

Concluderend: We willen graag deel B van de immunisatieproef herhalen, voor groepen 1, 2, 7, 8, 9, 11, 12, en 13. Met drie dieren per groep komt dit uit op 24 dieren.

(22-8-2013 15:40:20) Addendum goedgekeurd door [REDACTED]

Opmerkingen: 22082013: Om technische redenen wordt dit addendum goedgekeurd maar de uiteindelijke procedure zal in het vervolg addendum staan waarmee dit addendum komt te vervallen

(8/22/2013 3:50:34 PM) Addendum toegevoegd door [REDACTED]

Reden wijziging: Anders nl.

Omschrijving wijziging: We willen graag deel B van het immunisatiedeel van de proef overnieuw uitvoeren. Een van de belangrijke analyses (uitlezen van T-cel responsen) is voor dit gedeelte mislukt, waardoor we op dit vlak alleen data van deel A van het experiment hebben. Tijdens het opwerken van de miltcellen van deel B voor FACS analyse is er geen stimulatie peptide toegevoegd bij de miltcellen. Dit heeft er toe geleid dat de cellen niet gerestimuleerd waren, waardoor er geen peptide-specifieke respons meetbaar was in de FACS analyse. Het betreft dus helaas een menselijke fout. Door volgende keer gebruik te maken van een pipetteer checklist willen we voorkomen dat deze fout nogmaals wordt gemaakt.

Uit de serumanalyse (HI titers, serum IgG titers) hebben we vast kunnen stellen dat er nog weldegelijk een potent immuunrespons is opgewekt in de muizen. De T-cel responsen zijn echter in dit onderzoek de belangrijkste readout. Daarom verwachten we dat we na herhaling van de proef weldegelijk een positief resultaat kunnen behalen.

Uit deel A hebben we echter wel geconcludeerd dat een paar van onze controlegroepen geen T-cel reacties opwekken naar verwachting. Aangezien deze groepen niet essentieel waren voor de uitkomst van dit experiment, stellen we voor om deze groepen te excluderen in de herhaling van deel B, wat tot vermindering van het aantal dieren leidt.

Er zijn momenteel genoeg transgene muizen beschikbaar uit de fok om het experiment opnieuw te herhalen. De dieren zijn echter inmiddels ouder dan de gespecificeerde leeftijd in de PO (6-8 weken). De dieren zijn inmiddels 12-14 weken oud wanneer ze gebruikt kunnen worden. Uit de literatuur is gebleken dat het immuunsysteem van BL/6 muizen als 'young adult' wordt beschouwd tot een leeftijd van minstens 6 maanden oud ([REDACTED], [REDACTED]). Wij verwachten dus niet dat de discrepantie van 4-6 weken in leeftijd van de dieren tot grote effecten zal leiden in de immuunrespons. Jongere dieren zijn momenteel niet beschikbaar uit de fok. In een volgend dierexperiment zal gekeken worden naar de verschillen tussen dieren van 6-8 weken oud en 12-14 weken.

Concluderend: We willen graag deel B van de immunisatieproef herhalen, voor groepen 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, en 13. Met drie dieren per groep komt dit uit op 27 dieren. De leeftijd van de dieren zal 12-14 weken zijn.

(28-8-2013 11:15:47) Addendum goedgekeurd door [REDACTED]

Opmerkingen: wijzigingen in overeenstemming met wat afgesproken

**AUTORISATIE HISTORIE**

- (6-5-2013 11:30:54) Goedgekeurd door Artikel 12 functionaris [REDACTED]
- (5/7/2013 8:36:03 PM) Goedgekeurd door Artikel 9 functionaris [REDACTED]
- (22-5-2013 10:11:54) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]
- (5/30/2013 3:53:27 PM) Goedgekeurd door A14 functionaris [REDACTED]
- (5-6-2013 16:32:09) Goedgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED]
- (7-6-2013 15:19:26) Goedgekeurd door BVF functionaris [REDACTED]
- (7-6-2013 16:26:29) Positief advies gegeven door DEC functionaris [REDACTED] met de volgende opmerkingen.  
Opmerkingen: Tijdens de schriftelijke beoordeling van 22 mei 2013 hebben de leden van de DEC de volgende vragen/opmerkingen geformuleerd:
1. De groepen worden onderverdeeld in de subgroepen A en B. Zou je kunnen uitleggen waarom deze onderverdeling wordt gemaakt? Heeft de verdeling 2 x 3 i.p.v. 1 x 6 geen effect op de statistische analyse van de resultaten?
  2. Het is de DEC niet duidelijk waarom voor immunisatie een aantal lage doseringen getoetst worden terwijl daarvan vervolgens niet de mate van bescherming wordt getoetst. Graag uitleg.
- (14-3-2014 2:00:09) Mail gestuurd door de serveragent DPA-DEC advies validatie, wegens komende verstrijken van het DEC advies.
- (20-6-2014 2:00:08) Mail gestuurd door de serveragent DPA-DEC advies validatie, wegens verstrijken van geldigheid van het DEC advies.

**AUTORISATIE****Verantwoordelijke Art 12 functionaris:**

[REDACTED]  
(6-5-2013 11:30:54) Goedgekeurd door Artikel 12 functionaris [REDACTED]  
**Opmerkingen:**

**Verantwoordelijke onderzoeker (Art. 9)**

**Naam:** [REDACTED]

**Vervanger:** [REDACTED]

(5/7/2013 8:36:03 PM) Goedgekeurd door Artikel 9 functionaris [REDACTED]

**WTC Autorisatoren:**

**Opmerkingen:**

**Offerte Autorisatoren:**

[REDACTED]  
(5-6-2013 16:32:09) Goedgekeurd door Offerte functionaris [REDACTED]

**Bestelnummer:**

**Opmerkingen:**

**MKB Autorisatoren:**

(22-5-2013 10:11:54) Goedgekeurd door MKB functionaris [REDACTED]

**Opmerkingen:**

**BVF Autorisatoren:**

[REDACTED]  
(7-6-2013 15:19:26) Goedgekeurd door BVF functionaris [REDACTED]

**Opmerkingen:**

**Art. 14 Autorisatoren:**

(5/30/2013 3:53:27 PM) Goedgekeurd door A14 functionaris [REDACTED]

**Opmerkingen:**

**DEC Autorisatoren:**

(7-6-2013 16:26:29) Positief advies gegeven door DEC functionaris [REDACTED]

**Opmerkingen:**

De onderzoekers hebben op 30 mei 2013 als volgt geantwoord:

Ad 1. De onderverdeling in subgroepen is gedaan om de werklust te verlichten. Het is niet mogelijk om de analyses voor alle muizen op een dag uit te voeren, dus zijn de groepen onderverdeeld. Hetzelfde principe is ook gehanteerd bij de voorgaande proef, ██████████. Uit deze proef bleek dat er geen significant verschil tussen de twee subgroepen te zien was in onze analyses. Met deze methode spreiden de eventuele variantie tussen de twee verschillende dagen over alle experimentele groepen in plaats van alleen een gedeelte daarvan.

Ad 2. De groepen met lage doseringen die worden getoetst in het immunisatie gedeelte zijn controlegroepen om het exacte mechanisme van virosomen te bestuderen. Er is al in de voorgaande dierproef ([REDACTED]) aangetoond dat de groep "2 µg peptide-geladen virosomen+CpG" al hogere T-cel responsen opwekt dan de 2 µg peptide+IFA+CpG controle groep. Er wordt dus verwacht dat van alle lage doseringsgroepen, deze eerstgenoemde groep de hoogste T-cel responsen zal induceren. Deze groep is dan ook wel opgenomen in het beschermingsdeel (groep 18).



N.a.v. bovengenoemd antwoord heeft de DEC op 3 juni 2013 de volgende aanvullende vraag gesteld:



Hoewel dit ook in een vorige proefopzet is gedaan, is het incorrect te veronderstellen dat splitsing van de groep ( $n=6$ ) in twee subgroepen ( $n=3$ ) het eindresultaat oplevert. De statistische power, waarmee effecten kunnen worden waargenomen wijzigt door de gewijzigde proefopzet (1 groep van  $n=6$  is niet hetzelfde als twee groepen met  $n=3$  !). Het onderling vergelijken van twee identiek behandelde subgroepen ( $n=3$ ) heeft weinig zin, omdat de statistische power van een vergelijking met  $n=3$  laag is en er dus niet gauw een significant verschil gevonden zal worden.

De DEC vraagt de onderzoekers daarom een poweranalyse te maken of te laten maken voor de voorgestelde opzet met 2 subgroepen, om aan te tonen dat de grootte van de subgroep (n=3) nog voldoende is om met de vereiste gevoeligheid een significant effect aan te tonen. Een alternatief is de proefopzet zodanig te wijzigen dat een groeps grootte van 6 gehandhaafd kan worden. Dat kan wellicht door een aantal experimenten serieel in plaats van parallel uit te voeren.

De onderzoekers hebben op 3 juni 2013 als volgt geantwoord:

De groep (n=6) wordt weliswaar opgesplitst in twee groepen, maar dat betekent niet dat we de identiek behandelde groepen onderling (n=3) gaan vergelijken. Het gemiddelde van de waarden van de individuele 6 muizen wordt genomen, en deze wordt vergeleken met de gemiddelde waarde van de controlegroep(en). Aangezien de data per dier onafhankelijk en identiek verdeeld zijn, mogen de waarden van alle 6 de dieren gemiddeld worden. Alleen in het geval dat de twee subgroepen (n=3) van elkaar verschillen door een batchverschil (handeling, temperatuur etc.; conditiever verschillen tussen subgroep 1 en 2), mag dit niet. Echter, in eerdere experimenten (niet alleen ██████████ van deze auteur, maar ook meerdere andere proefopzetten van andere auteurs) is gebleken dat er geen batchverschil waargenomen is. Hieruit kunnen we concluderen dat opsplitsing van de experimentele groepen wetenschappelijk veroorloofd is.

In de DEC bijeenkomst van 6 juni 2013 hebben de onderzoekers het experiment toegelicht. De DEC acht de vragen adequaat beantwoord, maar wil de onderzoekers het volgende advies meegeven:

De DEC heeft tijdens de vergadering met u gesproken over de vraag of het hier een experiment betreft met een groeps grootte van N=6. U kiest namelijk om logistieke redenen voor een opzet waarbij u de groepen van 6 dieren verdeeld in twee subgroepen van elk 3 dieren (A en B). Subgroep B wordt 7 dagen later ingezet (gevaccineerd) dan subgroep A. De DEC is op de hoogte van het feit dat u hierover een statisticus geraadpleegd heeft, die aangegeven heeft dat u in dit geval mag aannemen dat het gewoon om een experiment met een N=6 gaat. De DEC blijft echter van mening dat er aan die aanname risico's kleven, bijvoorbeeld voor wat betreft de acceptatie van de resultaten door andere wetenschappers (bij publicatie). De DEC adviseert u daarom dringend om een nieuwe statistische berekening uit te voeren met de resultaten van proefopzet ██████████, alvorens dit experiment ██████████ in te zetten. Bij die berekening zou u er dan van uit moeten gaan dat het om een experiment met een N=3 gaat, dat u vervolgens nog een keer heeft herhaald. Als ook die berekening leidt tot de conclusie dat de resultaten significant zijn, dan is uitvoering van ██████████ zonder meer verantwoord. Als die berekening tot een andere conclusie leidt, dan adviseert de DEC u de opzet van het experiment te heroverwegen. De DEC is namelijk van mening dat het uitvoeren van een experiment waarvoor geldt dat het discutabel is of uit de resultaten wel conclusies mogen worden getrokken, ethisch niet aanvaardbaar is. De DEC benadrukt dat dit een dringend advies is en geen voorwaarde (gezien het feit dat u al een statisticus geraadpleegd heeft).

Op 7 juni 2013 heeft het secretariaat van de DEC het volgende antwoord geformuleerd:

De leden van de DEC achten de opmerkingen voldoende adequaat beantwoord. Onder de voorwaarde dat de eventuele wijzigingen van het experiment middels een addendum aan de commissie kenbaar gemaakt worden, concludeert de DEC dat er geen zwaarwegende bezwaren bestaan tegen het afgeven van een positief advies voor de uitvoering van het onderhavige experiment.