



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Boehringer Ingelheim Animal Health Operations BV

J.C. van Houtenlaan 36

1381 CP WEESP



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD224002016805

Datum 3 januari 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]

Op 22 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Marek's Disease vaccine candidate: Efficacy and Safety study following European Pharmacopoeia monograph 0589" met aanvraagnummer AVD224002016805. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### **Welke informatie nog nodig**

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

### **Onduidelijkheden**

Kunt u een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waar u:

- de 3V's (vraag D) aanvult voor vervanging en verfijning en
- het ongerief (vraag K) duidelijk weergeeft; indien er verschillende classificaties zijn geef dan aan voor hoeveel dieren welk ongerief van toepassing is.

Voor de groepen 6 en 7 is geeft u aan dat de proef stopt zodra 70% van de dieren is gestorven of na 70 dagen. Is het mogelijk hiervoor een andere werkwijze toe te passen waarbij de dood niet een uitleesparameter is? In hoeverre worden de humane eindpunten bij deze groepen toegepast? Indien van toepassing, wilt u dan de antwoorden over deze groepen verwerken in de Bijlage Dierproeven?

De DEC geeft aan dat uw instelling voornemens is om per januari 2017 bedrijfsonderdelen te ruilen, waarbij de diergeneesmiddelen naar uw instelling

komen. Het is mogelijk dat hiermee andere ontwikkelingen van een Marek-product tot uw beschikking komen, waarmee onderliggende aanvraag geen grote kans van slagen heeft. Dit raakt aan de haalbaarheid van dit project. Inmiddels is het januari 2017; kunt u aangeven of hier sprake van is?

**Datum:**  
3 januari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD224002016805

De DEC geeft aan dat de activiteiten op de locatie in Weesp waarschijnlijk in de loop van 2017 gaan stoppen en om dit project tijdig af te kunnen ronden, het ook op tijd gestart moet worden. In het aanvraagformulier is een termijn van 5 jaar aangegeven. Kunt u aangeven hoe lang u daadwerkelijk nodig hebt voor dit project? Indien het project wordt gestopt, zal het dan elders worden voortgezet? Indien het project afgerond wordt, wordt het vaccin dan daadwerkelijk op de markt gebracht, al dan niet door een andere partij?

### **Leges**

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

### **Opsturen binnen veertien dagen**

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

### **Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



## Melding bijlagen

U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg altijd deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt. Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw Gegevens

Naam instelling: Boehringer Ingelheim Animal Health Operations  
BV

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD224002016805

### 2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

**Datum:**

3 januari 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD224002016805

**3 Ondertekening**

Naam: .....

Datum: ..... - ..... - .....

Handtekening: .....

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:  
Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Aan : Centrale Commissie Dierproeven  
Van : DEC BI Weesp  
Datum : 04 januari 2017  
Referentie : HvD/17.673  
Onderwerp : Aanvullende informatie project AVD224002016805

Geachte medewerkers van de CCD,

Op 3 januari 2017 heb ik van u een verzoek om aanvullende informatie m.b.t. aanvraag AVD224002016805 ontvangen. Onderstaand treft u de antwoorden op uw vragen aan. Naar aanleiding van uw vragen is de bijlage dierproeven aangepast welke is bijgesloten.

De door de CCD gestelde vragen gaan over de aanvraag zelf, over het DEC advies en over de strategie van het bedrijf. Daarom zijn de antwoorden opgesteld in samenwerking tussen de onderzoeker, het R&D management, het site management en ondergetekende als vertegenwoordiger van de DEC (geen lid).

**Vraag CCD:** Kunt u een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waar u:

- de 3V's (vraag D) aanvult voor vervanging en verfijning en
- het ongerief (vraag K) duidelijk weergeeft; indien er verschillende classificaties zijn geef dan aan voor hoeveel dieren welk ongerief van toepassing is.

**Antwoord:** Het antwoord onder vraag D is vervangen door de volgende tekst waarin vervanging en verfijning beter staat omschreven:

*As chickens are the target animal species they are the best model to investigate, and as the aim of the study is to measure the effect of the vaccine on the animal itself, no replacement of the in-vivo model is possible.*

*In addition, the number of animals is determined as required by EU monograph 04/2013:0589.*

Onder vraag K is niet alleen het aantal dieren vermeld met ernstig ongerief, maar zijn alle dieren geklassificeerd:

*A maximum of 100 animals are classified as severe as mortality is expected after challenge. For all animals that are not (or will not be) classified as severe, mortality is not likely and protection against challenge is expected.*

*These 140 animals are therefore classified as moderate due to the number of procedures.*

**Vraag CCD:** Voor de groepen 6 en 7 is geeft u aan dat de proef stopt zodra 70% van de dieren is gestorven of na 70 dagen. Is het mogelijk hiervoor een andere werkwijze toe te passen waarbij de dood niet een uitleesparameter is? In hoeverre worden de humane eindpunten bij deze groepen toegepast? Indien van toepassing, wilt u dan de antwoorden over deze groepen verwerken in de Bijlage Dierproeven?

**Antwoord:** Voor de groepen 6 en 7 stopt de proef zodra de eis zoals beschreven in de Europese Farmacopee is bereikt. Deze eis beschrijft dat minimaal 70% van de controle dieren klinische verschijnselen van Marek's Disease, macroscopische leasies, en/of sterfte moeten vertonen.

Onder vraag A is de tekst als volgt aangepast:

...”chickens inoculated with vaccine-candidates and thereafter challenged will be observed for 70 days post challenge, and the unvaccinated challenged chickens until the criteria of at least 70% morbidity (clinical signs of MDV) and/or mortality is met up to a maximum of 70 days post challenge”....

Onder vraag D en I is beschreven op welke manier het humane eindpunt wordt toegepast.

**Vraag CCD:** De DEC geeft aan dat uw instelling voornemens is om per januari 2017 bedrijfsonderdelen te ruilen, waarbij de diergeneesmiddelen naar uw instelling komen. Het is mogelijk dat hiermee andere ontwikkelingen van een Marek-product tot uw beschikking komen, waarmee onderliggende aanvraag geen grote kans van slagen heeft. Dit raakt aan de haalbaarheid van dit project. Inmiddels is het januari 2017; kunt u aangeven of hier sprake van is?

**Antwoord:** Per 1 Januari 2017 is Merial onderdeel geworden van Boehringer Ingelheim. Dit betekent dat de gehele Merial organisatie geïntegreerd gaat worden binnen ons bedrijf. Voor die integratie is een periode van minimaal 1 jaar gepland. In dat jaar zullen alle lopende R&D projecten naast elkaar gelegd worden en zal er een keuze gemaakt worden welke projecten door zullen gaan en welke gestopt zullen worden. De pluimvee R&D groep in Hannover heeft bij het R&D management aangegeven dat m.b.t. het Marek project (waartoe deze aanvraag behoort) en snel besluit noodzakelijk is. Het is bij de R&D groep in Hannover bekend dat de DEC BI Weesp de voorwaarde gesteld heeft dat er eerst een evaluatie moet plaatsvinden voordat gestart kan worden met dit project. Deze evaluatie heeft nog niet plaatsgevonden maar is wel verwacht op redelijk korte termijn. De DEC BI Weesp heeft besloten dat er evengoed een advies gegeven kan worden omdat het advies voorwaardelijk is. Dat betekent dat het project niet zal starten tenzij de haalbaarheid van het project goed blijkt te zijn, ook in het licht van producten die in de Merial R&D pijplijn zitten en Marek vaccin dat Merial al op de markt heeft. Zodra de evaluatie van dit project door het R&D management heeft plaatsgevonden zal de CCD daarvan op de hoogte worden gesteld.

**Vraag CCD:** De DEC geeft aan dat de activiteiten op de locatie in Weesp waarschijnlijk in de loop van 2017 gaan stoppen en om dit project tijdig af te kunnen ronden, het ook op tijd

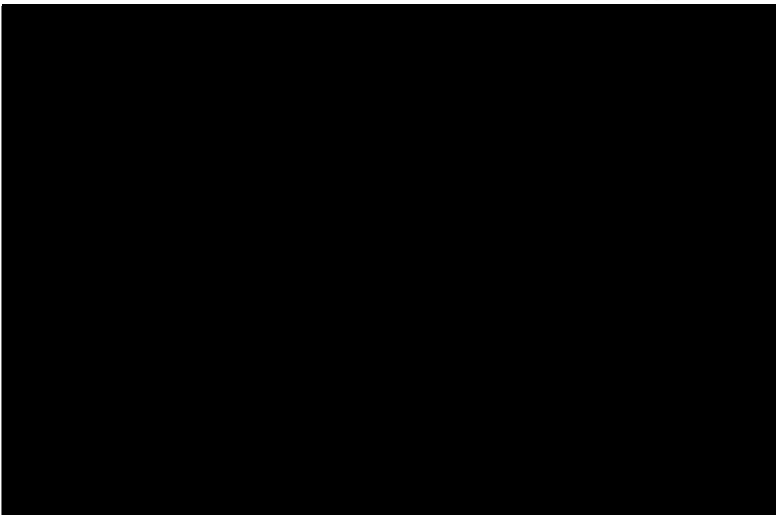
gestart moet worden. In het aanvraagformulier is een termijn van 5 jaar aangegeven. Kunt u aangeven hoe lang u daadwerkelijk nodig hebt voor dit project? Indien het project wordt gestopt, zal het dan elders worden voortgezet? Indien het project afgerond wordt, wordt het vaccin dan daadwerkelijk op de markt gebracht, al dan niet door een andere partij?

**Antwoord:** Het project bestaat uit maar 1 proef. Die proef duurt vanaf eerste toediening 120 dagen. Dat is daarmee ook de duur van het onderzoek (met uitzondering van rapportage). Het is de bedoeling dat het onderzoek is afgerond voor het eind van de zomer 2017. Als het project start dan is het onwaarschijnlijk dat het gestopt wordt. Bovendien zijn de vergunde dieren verbruikt zodra de proef gestart is. Als nadat de proef gestart is, de proef toch gestopt wordt dan is het dus niet toegestaan de proef elders voort te zetten omdat de vergunde dieren al verbruikt zijn. Als aan de evaluatie voorwaarde voldaan wordt en de vergunning verleend wordt, dan is het mogelijk dat het project toch niet in Weesp zal starten. In dat geval overweegt de vergunninghouder de vergunning over te dragen aan een andere Nederlandse vergunninghouder die dan de proef zou kunnen uitvoeren. In dat geval zal de CCD daarvan op de hoogte gesteld worden.

Als het project wordt afgerond dan zal naar alle waarschijnlijkheid het product ook op de markt gebracht worden. Daarbij moet wel worden aangetekend dat het product na afloop van dit project niet gereed is om op de markt te brengen. Er zullen nog diverse aanvullende stappen gezet moeten worden voordat dit het geval kan zijn. Bij die aanvullende stappen kunnen natuurlijk nog blokkades optreden die commercialisatie in de weg kunnen staan. Het project zal de evaluatie niet overleven als aan het eind van de evaluatie niet de intentie bestaat om het project door te zetten tot en met commercialisatie.

Ik hoop hiermee u voldoende geïnformeerd te hebben om de aanvraag verder te beoordelen.

Mede namens de onderzoeker, DEC BI Weesp, R&D management en Site management,.





## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	<b>22400</b>	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	<b>BIAHO bv</b>	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number <b>3.4.4.1</b>	Type of animal procedure <b>201612.1 Increase in virulence and MID of Marek's Disease vaccine candidate</b>

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

**The testing of Marek's Disease vaccine candidates following European Pharmacopoeia (EP) monograph 0589 includes a number of different animal studies which evaluate and subsequently describe the efficacy and safety of vaccine candidates. Two studies will be combined to reduce the number of positive controls.**

**Among them is the study which evaluates the safety of a vaccine candidate once it has been sequentially passaged five times in the target species with the lowest passage of the vaccine candidate. For the latter usually the masterseed virus (MS) is used. The passage study is currently performed in a contract research organization (CRO) under GLP conditions. The study design described here is defined in EP monograph 04/2013:0589 section 2-4-1 using material obtained as described in section 2-4-2. The MS and virus material resulting from passage 5 (MS+5) in chickens (here CVI 988 containing peripheral blood mononuclear cells (PBMC)) will be applied to one-day-old SPF chickens by the least safe route for chickens, determined to be the intramuscular route (i.m.). The second part of the study will be performed to determine the Minimal Immunizing Dose (MID) in commercial layers following section 2-4-3 from EP monograph 04/2013:0589. As the target product profile states that the vaccine to be marketed needs to have the subcutaneous route (s.c.) for the label claim, the MID has to be determined for this route.**



As control a group of unvaccinated day-old SPF chickens and a group of unvaccinated commercial layers will be inoculated via the i.m. route with a very virulent Marek's disease virus. Chickens inoculated with the vaccine-candidates only will be observed for 120 days post inoculation, chickens inoculated with vaccine-candidates and thereafter challenged will be observed for 70 days post challenge, and the unvaccinated challenged chickens until the criteria of at least 70% morbidity (clinical signs of MDV) and/or mortality is met up to a maximum of 70 days post challenge. The primary outcome of the test is the presence or absence of notifiable clinical signs, macroscopic lesions of Marek's disease or death attributable to the vaccine virus and/or challenge virus.

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

For the safety part of the study, day-old SPF chickens will be inoculated intramuscular with either the MS (Clone01A-P31) or PBMC resulting from chicken passage 5 of the MS (MS+5). One group of SPF chickens will serve as control which will be inoculated intramuscular with a virulent Marek's disease virus to verify the susceptibility of the used genetic background of that SPF chicken. The dose used is according to EP.

For the MID part of the study, day-old unvaccinated commercial layers will be vaccinated subcutaneous with one of three doses of the MS. The vaccinated birds will be challenged 7 days after vaccination via the intramuscular route. One group of day-old commercial layers will serve as control which will be inoculated intramuscular with a virulent Marek's disease virus to verify the susceptibility of the commercial flock.

The observation period for the vaccinated groups of the safety part of the study is 120 days post inoculation, while the remaining chickens will be observed for 70 days post challenge. The different groups and treatments are described in Table 2.

**Table 1. Schedule of events**

Study day (SD)	Activity
SD 0	Inclusion of day-old chicks Vaccinate chickens with MS (SPF; i.m.), MS+5 (SPF; i.m.), or with one of three doses of MS P36 (MDA-positive; s.c.)
SD 7	Challenge the vaccinated and unvaccinated MDA-positive birds with virulent Marek's disease virus (i.m.) Challenge unvaccinated SPF birds with virulent Marek's disease virus (i.m.)
SD 1- 120	Clinical examination of vaccinated groups of the safety part of the study, at least once daily Record clinical signs, remove sick individuals, perform necropsy
SD 1 - 77	Clinical examination of all other groups at least once daily Record clinical signs, remove sick individuals, perform necropsy
SD 77	End of observation period for the virulent Marek's disease virus inoculated groups: euthanize all remaining chickens of this group, perform necropsy
SD120	End of observation period for remaining chickens; euthanize all remaining chickens of these groups, perform necropsy

**Table 2. Experimental design**

Group	Source of chickens	No of animals per group	Vaccine	Route of administration	TCID <sub>50</sub> /dose in 0,2ml
1	SPF	40	Clone01A-P31 (MS)	i.m.	10fold dose
2	SPF	40	MS+5	i.m.	10fold dose
3	commercial	30	Clone01A-P31 Passage 36	s.c.	tbd
4	commercial	30	Clone01A-P31 Passage 36	s.c.	tbd

5	commercial	30	Clone01A-P31 Passage 36	s.c.	tbd
6	SPF	40	virulent Marek's disease virus	i.m.	TBD <sup>a</sup>
7	commercial	30	virulent Marek's disease virus	i.m.	TBD <sup>a</sup>

<sup>a</sup>The challenge dose which causes the clinical signs as per EP 04/2013:0589 will be used

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

**The minimum numbers of chickens are described in the EU monograph (04/2013:0589).**

#### B. The animals

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

**In total 120 SPF birds and 120 commercial layers will enrol in this study. Both male as female animals will be used based on the assumption that there is a 50%/50% gender ratio.**

**Unvaccinated challenged, and vaccinated challenged birds will be observed until 70 days post challenge (virulent Marek's disease virus), and all vaccinated unchallenged birds until 120 days post vaccination.**

#### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### D. Replacement, reduction, refinement

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

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

**Animals exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached. All animals will be inspected daily to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set and the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering. All fixation and administration procedures will be performed by experienced animal technicians, ensuring fast and accurate administration minimizing stress for the animals.**

**The animals will be housed in animal rooms equipped with HEPA filters.**

### Repetition and duplication

#### E. Repetition

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

**The tested vaccine candidate was passaged recently in SPF chickens at a CRO. Since this is a new masterseed this pivotal safety and efficacy study as explained in this proposal has not been performed before.**

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

### G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

**To accurately determine the performance of the vaccine candidate the immune system must not be iatrogenically influenced. Therefore, no analgesics will be used as this will interfere with the study results.**

**The animals will be clinically inspected at least daily to ensure accurate determination of the humane endpoint and timely euthanasia.**

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

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

**Stress due to handling and identification measures; stress due to vaccine and challenge administration.**

Explain why these effects may emerge.

**Fixation to place identification wing-tags; subcutaneous and intramuscular inoculation.**

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

**All fixation and administration procedures will be performed by experienced animal technicians, ensuring fast and accurate administration minimizing stress for the animals.**

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

**Animals exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached. Severe clinical signs leading to an animal being incapable of displaying normal behaviour and/or maintaining its homeostasis will be euthanized. All animals will be inspected daily to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set and the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering.**

Indicate the likely incidence.

**Severe: between 70% and 100% of groups 6 and 7, maximum 70 animals (positive control animals inoculated with the virulent Marek's disease virus); and 100% for the lowest dose group, maximum 30 animals. Total 100 animals.**

#### **K. Classification of severity of procedures**

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

**A maximum of 100 animals are classified as severe as mortality is expected after challenge. For all animals that are not (or will not be) classified as severe, mortality is not likely and protection against challenge is expected. These 140 animals are therefore classified as moderate because of the number of procedures.**

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

**Animals are inoculated with a virulent Marek's disease virus which causes mortality.**

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	22400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	BIAHO bv	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number  3.4.4.1	Type of animal procedure  201612.1 Increase in virulence and MID of Marek's Disease vaccine candidate

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

**The testing of Marek's Disease vaccine candidates following European Pharmacopoeia (EP) monograph 0589 includes a number of different animal studies which evaluate and subsequently describe the efficacy and safety of vaccine candidates. Two studies will be combined to reduce the number of positive controls.**

**Among them is the study which evaluates the safety of a vaccine candidate once it has been sequentially passaged five times in the target species with the lowest passage of the vaccine candidate. For the latter usually the masterseed virus (MS) is used. The passage study is currently performed in a contract research organization (CRO) under GLP conditions. The study design described here is defined in EP monograph 04/2013:0589 section 2-4-1 using material obtained as described in section 2-4-2. The MS and virus material resulting from passage 5 (MS+5) in chickens (here CVI 988 containing peripheral blood mononuclear cells (PBMC)) will be applied to one-day-old SPF chickens by the least safe route for chickens, determined to be the intramuscular route (i.m.). The second part of the study will be performed to determine the Minimal Immunizing Dose (MID) in commercial layers following section 2-4-3 from EP monograph 04/2013:0589. As the target product profile states that the vaccine to be marketed needs to have the subcutaneous route (s.c.) for the label claim, the MID has to be determined for this route.**

As control a group of unvaccinated day-old SPF chickens and a group of unvaccinated commercial layers will be inoculated via the i.m. route with a very virulent Marek's disease virus. Chickens inoculated with the vaccine-candidates only will be observed for 120 days post inoculation, chickens inoculated with vaccine-candidates and thereafter challenged will be observed for 70 days post challenge, and the unvaccinated challenged chickens until the criteria of at least 70% morbidity (clinical signs of MDV) and/or mortality is met up to a maximum of 70 days post challenge. The primary outcome of the test is the presence or absence of notifiable clinical signs, macroscopic lesions of Marek's disease or death attributable to the vaccine virus and/or challenge virus.

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

For the safety part of the study, day-old SPF chickens will be inoculated intramuscular with either the MS (Clone01A-P31) or PBMC resulting from chicken passage 5 of the MS (MS+5). One group of SPF chickens will serve as control which will be inoculated intramuscular with a virulent Marek's disease virus to verify the susceptibility of the used genetic background of that SPF chicken. The dose used is according to EP.

For the MID part of the study, day-old unvaccinated commercial layers will be vaccinated subcutaneous with one of three doses of the MS. The vaccinated birds will be challenged 7 days after vaccination via the intramuscular route. One group of day-old commercial layers will serve as control which will be inoculated intramuscular with a virulent Marek's disease virus to verify the susceptibility of the commercial flock.

The observation period for the vaccinated groups of the safety part of the study is 120 days post inoculation, while the remaining chickens will be observed for 70 days post challenge. The different groups and treatments are described in Table 2.

**Table 1. Schedule of events**

Study day (SD)	Activity
SD 0	Inclusion of day-old chicks Vaccinate chickens with MS (SPF; i.m.), MS+5 (SPF; i.m.), or with one of three doses of MS P36 (MDA-positive; s.c.)
SD 7	Challenge the vaccinated and unvaccinated MDA-positive birds with virulent Marek's disease virus (i.m.) Challenge unvaccinated SPF birds with virulent Marek's disease virus (i.m.)
SD 1- 120	Clinical examination of vaccinated groups of the safety part of the study, at least once daily Record clinical signs, remove sick individuals, perform necropsy
SD 1 - 77	Clinical examination of all other groups at least once daily Record clinical signs, remove sick individuals, perform necropsy
SD 77	End of observation period for the virulent Marek's disease virus inoculated groups: euthanize all remaining chickens of this group, perform necropsy
SD120	End of observation period for remaining chickens; euthanize all remaining chickens of these groups, perform necropsy

**Table 2. Experimental design**

Group	Source of chickens	No of animals per group	Vaccine	Route of administration	TCID <sub>50</sub> /dose in 0,2ml
1	SPF	40	Clone01A-P31 (MS)	i.m.	10fold dose
2	SPF	40	MS+5	i.m.	10fold dose
3	commercial	30	Clone01A-P31 Passage 36	s.c.	tbd
4	commercial	30	Clone01A-P31 Passage 36	s.c.	tbd

5	commercial	30	Clone01A-P31 Passage 36	s.c.	tbd
6	SPF	40	virulent Marek's disease virus	i.m.	TBD <sup>a</sup>
7	commercial	30	virulent Marek's disease virus	i.m.	TBD <sup>a</sup>

<sup>a</sup>The challenge dose which causes the clinical signs as per EP 04/2013:0589 will be used

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

**The minimum numbers of chickens are described in the EU monograph (04/2013:0589).**

### B. The animals

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

**In total 120 SPF birds and 120 commercial layers will enrol in this study. Both male as female animals will be used based on the assumption that there is a 50%/50% gender ratio. Unvaccinated challenged, and vaccinated challenged birds will be observed until 70 days post challenge (virulent Marek's disease virus), and all vaccinated unchallenged birds until 120 days post vaccination.**

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

**As chickens are the target animal species they are the best model to investigate, and as the aim of the study is to measure the effect of the vaccine on the animal itself, no replacement of the in-vivo model is possible.**

**In addition, the number of animals is determined as required by EU monograph 04/2013:0589.**

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

**Animals exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached. All animals will be inspected daily to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set and the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering. All fixation and administration procedures will be performed by experienced animal technicians, ensuring fast and accurate administration minimizing stress for the animals.**

**The animals will be housed in animal rooms equipped with HEPA filters.**

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

**The tested vaccine candidate was passaged recently in SPF chickens at a CRO. Since this is a new masterseed this pivotal safety and efficacy study as explained in this proposal has not been performed before.**

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

### G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

**To accurately determine the performance of the vaccine candidate the immune system must not be iatrogenically influenced. Therefore, no analgesics will be used as this will interfere with the study results.**

**The animals will be clinically inspected at least daily to ensure accurate determination of the humane endpoint and timely euthanasia.**

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

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

**Stress due to handling and identification measures; stress due to vaccine and challenge administration.**

Explain why these effects may emerge.

**Fixation to place identification wing-tags; subcutaneous and intramuscular inoculation.**

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

**All fixation and administration procedures will be performed by experienced animal technicians, ensuring fast and accurate administration minimizing stress for the animals.**



**J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

**Animals exhibiting severe clinical signs of illness or discomfort which leads to impaired physiological behaviour and/or the inability to maintain homeostasis will be euthanized, as the humane endpoint has therefore been reached. Severe clinical signs leading to an animal being incapable of displaying normal behaviour and/or maintaining its homeostasis will be euthanized. All animals will be inspected daily to ensure that clinical signs are not missed and therefore the humane endpoint is accurately set and the animal is euthanized timely, preventing unnecessary suffering.**

Indicate the likely incidence.

**Severe: between 70% and 100% of groups 6 and 7, maximum 70 animals (positive control animals inoculated with the virulent Marek's disease virus); and 100% for the lowest dose group, maximum 30 animals. Total 100 animals.**

**K. Classification of severity of procedures**

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

**A maximum of 100 animals are classified as severe as mortality is expected after challenge. For all animals that are not (or will not be) classified as severe, mortality is not likely and protection against challenge is expected. These 140 animals are therefore classified as moderate because of the number of procedures.**

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

**Animals are inoculated with a virulent Marek's disease virus which causes mortality.**

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Boehringer Ingelheim Animal Health Operations BV

J.C. van Houtenlaan 36

1381 CP WEESP



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD224002016805

**Bijlagen**

1

Datum 30 januari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]

Op 22 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Marek's Disease vaccine candidate: Efficacy and Safety study following European Pharmacopoeia monograph 0589" met aanvraagnummer AVD224002016805. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 4 januari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof de 3V's, het ongerief, de humane eindpunten en de haalbaarheid van het project.

### **Beslissing**

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

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

De voorwaarde betreffende de evaluatie van lopende projecten is overgenomen uit het DEC-advies.

U kunt met uw project "Marek's Disease vaccine candidate: Efficacy and Safety study following European Pharmacopoeia monograph 0589" starten. De vergunning wordt afgegeven van 30 januari 2017 tot en met 31 december 2017. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de experimenten een kortere doorlooptijd hebben en hiervoor geen vergunning van 5 jaar nodig is.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Beoordeling achteraf**

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

**Datum:**  
30 januari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD224002016805

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Biaho gevoegd. Dit advies is opgesteld op 21 december 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.  
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Bezwaar**

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

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

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


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

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven

namens de

  
Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
  - DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Boehringer Ingelheim Animal Health Operations  
BV

Adres: Postbus 36

Postcode en plaats: 1380 AA WEESP

Deelnemersnummer: 22400

deze projectvergunning voor het tijdvak 30 januari 2017 tot en met 31 december 2017, voor het project "Marek's Disease vaccine candidate: Efficacy and Safety study following European Pharmacopoeia monograph 0589" met aanvraagnummer AVD224002016805, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Biaho. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 december 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 december 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 21 december 2016, ontvangen op 22 december 2016.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 4 januari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Increase in virulence and MID of Marek's Disease vaccine candidate</b>				
	Kippen /	240	42% Ernstig 58% Matig	

### Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2018 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

**Aanvraagnummer:**

AVD224002016805

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IVD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Voor aanvang van het project vindt er een evaluatie plaats door het verantwoordelijke management van alle lopende projecten binnen uw instelling, waaronder deze aanvraag. Als uit de evaluatie blijkt dat onderliggend project de potentie heeft om een product op te leveren dat beter is dan het huidige vaccin binnen uw instelling en dat beter is dan wat er in ontwikkeling is in andere projecten binnen uw instelling, kunt u het project starten. Als dit niet uit de evaluatie blijkt, dan is de haalbaarheid van de einddoelstelling slecht en kan onderliggend project niet starten. De uitkomst van de evaluatie meldt u aan de CCD.



**Aanvraagnummer:**  
AVD224002016805

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

**Aanvraagnummer:**  
AVD224002016805

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

#### **Einde van een dierproef**

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

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

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

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

#### **Beoordeling achteraf**

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