

	Inventaris Wob-verzoek W20-01		wordt verstrekt			weigeringsgronden			
nr.	document NTS20185285	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	project voorstel				x			x	
3	Description Animal Procedure				x			x	
3a	Bijlage 1				x			x	
3b	Bijlage 2				x			x	
3c	Bijlage 3				x			x	
3d	Bijlage 4				x			x	
3e	Bijlage 5				x			x	
3f	Bijlage 6				x			x	
3g	Bijlage 7				x			x	
4	NTS	x							
5	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
6	DEC advies				x		x	x	
7	e-mail correspondentie				x		x		
8	Advies secretariaat aan CCD				x		x	x	x
9	aanvullend advies secretariaat aan CCD				x			x	x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	

AVD4010020185285

## Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

## 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemenummer van de NVWA? Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemenummer contact op met de NVWA.	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemenummer in <input type="checkbox"/> Nee > U kunt een aanvraag doen	40100
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer	Stichting Wageningen Research 10.2.e 09098104
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.	Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats Iban Tenaamstelling van het rekeningnummer	Akkermaalsbos 12 59 6700AW Wageningen NL10RABO0397068465 Wageningen University & Research
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker	(Titel) naamen voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	10.2.e Onderzoeker 10.2.g 10.2.e 10.2.e

[x] Dhr. [ ] Mw.

1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) naam en voorletters	[ ] Dhr. [ ] Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		Email adres	
1.6	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) naam en voorletters	[ ] Dhr. [ ] Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		Email adres	
1.7	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

## 2 Over uw aanvraag

2.1	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn	
		Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2	
		<input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn	
		Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3	
2.3	Is dit een wijziging voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	<input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier	
		<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3	

2.3	Is dit een melding voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

### 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en startdatum	1-5-2018	
	einddatum van het project?	1-5-2023	
3.2	Wat is de titel van het project?	Ontwikkeling van influenza vaccines	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Ontwikkeling van influenza vaccines	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Wageningen UR
		Postadres	Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
		E-mailadres	dec@wur.nl

### 4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 2363,-
4.2	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD	<input type="checkbox"/> Wijziging €
		<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso
		<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur



voldoen.  
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel + 7 bijlagen

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

Bestelorder WUR1149204

## 6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

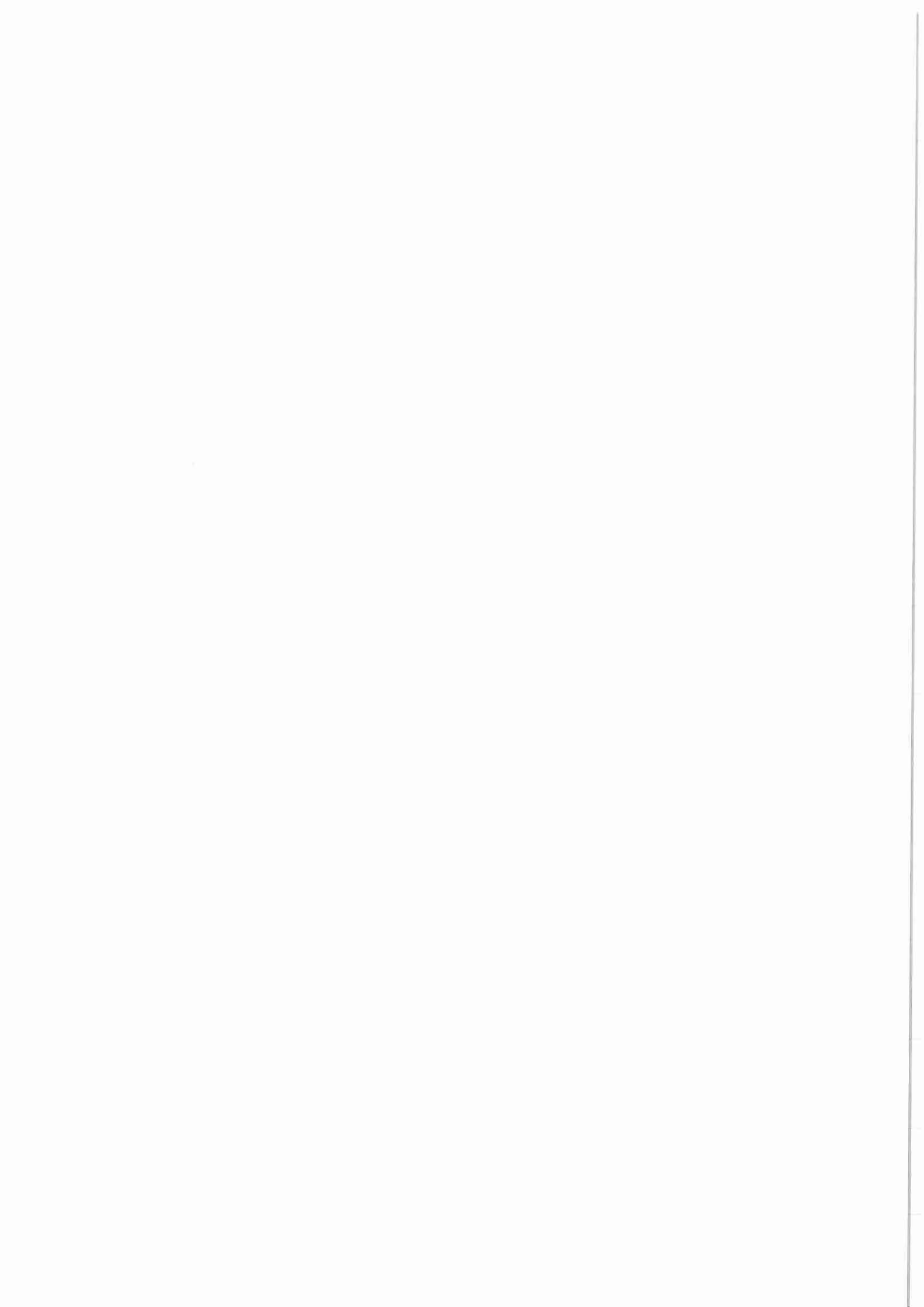
Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.

Centrale Commissie  
Dierproeven Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	10.2.e	10.2.g
Functie	10.2.e	
Plaats	Wageningen	
Datum	5-4-2018	
Handtekening		



# 2

## Form Project proposal

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research
1.3	Provide the title of the project.	Ontwikkeling van influenza vaccines

## 2 Categories

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

---

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

---

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

#### Achtergrond:

Influenza zorgt jaarlijks voor epidemieën bij de mens. Dit veroorzaakt ziekte (schattingen variëren van 3-5 miljoen ernstig zieken wereldwijd per jaar) soms met longontsteking, die zo ernstig kan zijn dat er dodelijke slachtoffers te betreuren zijn (sterftecijfer varieert van 250.000 tot 500.000 wereldwijd per jaar). Naast het menselijk lijden, veroorzaakt dit een niet geringe economische schade vanwege b.v. ziekmeldingen en de daarmee samenhangende absentie van werk en de kosten van hospitalisatie. Soms groeien deze epidemieën uit tot een zogenaamde pandemie, waarvan de impact op zowel de volksgezondheid als de economie nog groter is. Er bestaat voor influenza een vaccinatie aanpak. Echter door de genetische variatie van het influenza virus is het nodig om elke jaar, zo kort mogelijk op het vaccinatieseizoen (het najaar voor het noordelijk halfrond, en het voorjaar voor zuidelijk halfrond), een nieuw vaccin te ontwikkelen op basis van een schatting/voorspelling door de WHO (Bron: WHO).

De bestaande vaccins bieden bescherming tegen rondgaande influenza stammen, waarvan de WHO inschat dat deze een probleem zullen worden gedurende het jaarlijks griepseizoen. Van tijd tot tijd slaan influenza stammen toe ondanks dat er gevaccineerd wordt. Dit zijn influenza stammen waartegen de gebruikte vaccins slechts beperkte of helemaal geen bescherming bieden. Epidemieën die veroorzaakt worden door dit soort stammen hebben een grote potentie om uit te groeien tot een pandemie, welke grote aantallen slachtoffers en grote economische schade kan veroorzaken. In de winter 2014-2015, winter 2015-2016 en de winter 2017-2018 was er sprake van influenza epidemieën, omdat de in het vaccin opgenomen stammen niet geheel overeen kwamen met de in het veld aanwezige stammen. Hierdoor was er sprake van een verhoogde infectiedruk en daarmee meer ziekte gevallen. Binnen dit project is het de bedoeling om de bestaande vaccinatie aanpak te verbeteren en om geheel nieuwe vaccinatie strategieën te ontwikkelen. Het is de bedoeling dat deze nieuwe vaccins op tal van punten verbetering brengen t.o.v. de bestaande praktijk. De werkzaamheid van deze vaccins wordt getest in influenza-muismodellen. Muismodellen en hun voorspellende waarde worden binnen de wetenschappelijke wereld breed gedragen in tal van velden, al heeft het ook zijn beperkingen. Deze influenza-muismodellen specifiek hebben bewezen voorspellende waarde voor de reacties die deze vaccins opwekken in de mens en men kan in deze modellen de fundamentele

werkingsmechanismen ontrafelen. Experimentele data verkregen in de influenza-muismodellen heeft geleid tot humane trials, en binnen deze trials worden soortgelijke resultaten geboekt als in de muis. Na de experimentele fase in muizen worden de vaccinkandidaten ook bij andere onderzoeksinstituten getest in andere diermodellen en uiteindelijk ook in mensen.

Vanaf 2006 tot 2016 is binnen het instituut in samenwerking met industriële partner succesvol gewerkt aan antivirale interventiemethodieken (o.a. passieve immunisatie tegen influenza) en vernieuwde/verbeterde vaccinatiemethodieken. De industriële partner ontwikkeld volgens de laatste inzichten verkregen uit literatuur, *in vitro* onderzoek en voorgaande *in vivo* resultaten (uit o.a. eerder toegekende vergunningen) nieuwe vaccinkandidaten en interventie methodieken. Deze worden vervolgens *in vivo* getest bij het WBVR in muizen-influenza modellen. Echter is het einddoel nog niet gehaald en is aanvullend werk nodig, hiertoe is o.a. deze vergunningsaanvraag nodig.

### 3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

#### Doel:

Het hoofddoel van het project is het verminderen en bij voorkeur voorkomen van ziekte ten gevolge van influenza infecties bij mensen door de ontwikkeling van verbeterde en nieuwe influenzavaccins en antivirale middelen. Daarbij wordt de werkzaamheid van voornamelijk vaccinkandidaten onderzocht door gebruik te maken van verschillende influenza muismodellen. Nevendoelen zijn: Inzicht verkrijgen in de werkingsmechanismen van de toegepaste vaccins. En ook de interactie tussen het influenza virus en het afweersysteem van gastheer pogen op te helderen.

Haalbaarheid: De voorgaande jaren zijn al een aantal veelbelovende resultaten geboekt, welke tot verbeterde vaccins zullen leiden in de komende jaren, die onderweg zijn naar onderzoek in mensen en wetenschappelijke publicaties. Het is hiermee aannemelijk dat resultaten uit dit project hun weg naar de kliniek zullen vinden.

#### Referenties:

- [Impagliazzo A1](#), [Milder F2](#), [Kuipers H2](#), [Wagner MV3](#), [Zhu X4](#), [Hoffman RM4](#), [van Meersbergen R2](#), [Huizingh J2](#), [Wannings P2](#), [Verspuij J2](#), [de Man M2](#), [Ding Z3](#), [Apetri A2](#), [Kükler B2](#), [Sneekes-Vriese E2](#), [Tomkiewicz D2](#), [Laursen NS4](#), [Lee PS4](#), [Zakrzewska A2](#), [Dekking L2](#), [Tolboom J2](#), [Tettero L2](#), [van Meerten S2](#), [Yu W4](#), [Koudstaal W2](#), [Goudsmit J2](#), [Ward AB4](#), [Meijberg W2](#), [Wilson IA5](#), [Radošević K2](#) A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science*. 2015 Sep 18;349(6254):1301-6. doi: 10.1126/science.aac7263. Epub 2015 Aug 24.

- Roos A, Roozendaal R, Theeuwsen J, Riahi S, Vaneman J, Tolboom J, Dekking L, Koudstaal W, Goudsmit J, Radošević K. Protection against H5N1 by multiple immunizations with seasonal influenza vaccine in mice is correlated with H5 cross-reactive antibodies. 2015. Vaccine. 33:1739-47.

- Roozendaal R, Tolboom J, Roos A, Riahi S, Theeuwsen J, Bujny MV, Klaren V, Korse HJ, Dekking L, Grootenhuis A, Weverling GJ, Koudstaal W, Goudsmit J, Radošević K. Transient humoral protection against H5N1 challenge after seasonal influenza vaccination of humans. 2014. PLoS One. 30;9(7):e103550.

### **3.3 Relevance**

---

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

---

#### Belang:

Het uiteindelijke doel van het project is het verminderen en bij voorkeur voorkomen van ziekte veroorzaakt door influenza infecties bij mensen door de ontwikkeling van verbeterde en nieuwe influenzavaccins en antivirale middelen. Stap voor stap worden in dit programma vaccins verbeterd. De heilige graal is een universeel influenzavaccin. De wetenschappelijk relevantie is dat, gedurende dit proces van vaccinverbetering, de fundamentele kennis over de werking van vaccins, het immuunsysteem en influenza virussen vergroot wordt. Deze kennis zal ook in de preventie en bestrijding van andere infectieziekten, zoals b.v. hRSV, gebruikt worden. De maatschappelijke relevantie is te vinden in de verbeterde volksgezondheid en de vermindering van de daaraan gekoppelde economische schade, wanneer de kennis die opgedaan wordt binnen dit project, wordt toegepast in de vorm van verbeterde en vernieuwde vaccins en antivirale middelen.

### **3.4 Research Strategy**

---

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

---

#### Onderzoeksstrategie:

Vanuit de onderzoeklijnen van het instituut en private partners komen veelbelovende manieren om influenza te bestrijden voort. Hiervan moet dan nog bewezen worden dat deze in levende organismen werken, zelfs als de resultaten behaald in het laboratorium dit lijken te beloven.

De overkoepelende aanpak is om vanuit de laatste inzichten in de wetenschappelijke wereld verbeterde en nieuwe vaccins te produceren. Leidraad hierbij zijn de resultaten, die in het verleden zijn behaald met **10.2.g**. Deze antilichamen zijn zowel profylactisch als therapeutisch zeer effectief tegen influenza infecties. Na toediening van deze antilichamen aan immunologisch naïeve dieren en mensen bleek de bescherming volledig en erg breed: met een en hetzelfde antilichaam konden influenzavirussen van verschillende subtypes worden geneutraliseerd. Deze antilichamen zijn verder ontwikkeld en worden momenteel getest in griepatiënten. Deze

resultaten illustreren iets dat eerst voor onmogelijk werd gehouden, namelijk 10.2.g

De ontwerpstrategie van de verbeterde en nieuwe vaccins benadert het probleem vanaf de andere kant. 10.2.g

10.2.g

. Hieruit zijn er veelbelovende vaccinkandidaten ontwikkeld en getest. In dit project worden de geselecteerde vaccins doorontwikkeld/verbeterd. Het uiteindelijke en ultieme doel is de ontwikkeling van een universeel griepvaccin, dat mensen langdurig beschermt tegen alle mogelijke influenza varianten.

#### Referenties:

- Dreyfus C, Laursen NS, Kwaks T, Zuijdgeest D, Khayat R, Ekiert DC, Lee JH, Metlagel Z, Bujny MV, Jongeneelen M, van der Vlugt R, Lamrani M, Korse HJ, Geelen E, Sahin Ö, Sieuwerts M, Brakenhoff JP, Vogels R, Li OT, Poon LL, Peiris M, Koudstaal W, Ward AB, Wilson IA, Goudsmit J, Friesen RH. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. 2012. Science. 337:1343-8.
- Ekiert DC, Friesen RH, Bhabha G, Kwaks T, Jongeneelen M, Yu W, Ophorst C, Cox F, Korse HJ, Brandenburg B, Vogels R, Brakenhoff JP, Kompier R, Koldijk MH, Cornelissen LA, Poon LL, Peiris M, Koudstaal W, Wilson IA, Goudsmit J. 2011. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. Science 333:843-850.
- Koudstaal W, Koldijk MH, Brakenhoff JP, Cornelissen LA, Weverling GJ, Friesen RH, Goudsmit J. 2009. Pre- and postexposure use of human monoclonal antibody against H5N1 and H1N1 influenza virus in mice: viable alternative to oseltamivir. J. Infect. Dis. 200:1870-1873.
- Throsby M, van den Brink E, Jongeneelen M, Poon LL, Alard P, Cornelissen L, Bakker A, Cox F, van Deventer E, Guan Y, Cinatl J, ter Meulen J, Lasters I, Carsetti R, Peiris M, de Kruif J, Goudsmit J. 2008. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells. PLoS One 3:e3942.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

#### Deelproject A: Opzetten, uitwerken en testen van nieuwe vaccinatietechnieken

Binnen dit deelproject zullen de volgende typen experimenten worden uitgevoerd: **Type 1: Vaccinatie/challenge experimenten:**



Het merendeel van de experimenten binnen dit project zijn vaccinatie-challenge experimenten. In dit type experiment is het primair de bedoeling om na te gaan of een bepaalde vaccinsamenstelling effectief beschermt tegen influenzavirus infecties. Daarvoor worden muizen een of meerdere keren gevaccineerd, waarna ze worden geïnfecteerd met influenzavirus (de challenge). Om de meest optimale vaccinkandidaten te kunnen selecteren voor verdere ontwikkeling zullen verschillende aspecten met elkaar worden vergeleken: *i*) samenstelling van vaccins, b.v. hoeveelheid antigeen, aard en hoeveelheid van een immuunstimulerend additief, *ii*) aantal vaccinaties, en *iii*) toedieningsroute. De groepsgrootte wordt m.b.v. van statistische analyse bepaald. Hierbij wordt rekening gehouden met de voorgaande variaties, de karakteristieken van het gebruikte influenza muismodel en de resultaten van eerder uitgevoerde studies.

#### Deelproject B: Opzetten en controle van influenza modellen in muizen

Voor onderzoek naar de werkzaamheid van influenzavaccins worden influenza muismodellen gebruikt. Binnen het Instituut is een uitgebreide set modellen beschikbaar. Toch kan het nodig zijn om een nieuw model op te zetten om na te kunnen gaan of een vaccin kandidaat ook tegen een andere influenza variant kan beschermen. Dit geldt bv. voor een H2 type influenzavirus, die nog in de set ontbreekt, maar wel belangrijk is omdat het pandemische potentie heeft (het is zo lang geleden dat zo'n virus rondwaarde dat een groot deel van de wereldbevolking geen H2 immuniteit meer heeft). Incidenteel is het nodig om bestaande influenzamodellen opnieuw te valideren/karakteriseren, bijvoorbeeld bij de overgang van de oude naar een nieuw-geproduceerde virusstock.

Voor het opzetten en controleren van muismodellen zijn de volgende dierexperimenten nodig:

##### **Type 2: Adaptatie in muis:**

Omdat de meeste influenzavirussen niet direct virulent zijn in muizen, moeten ze eerst aan de nieuwe gastheer worden aangepast d.m.v. long passages.

##### **Type 3: Bepalen van de optimale infectiedosis:**

In dit experiment worden muizen geïnfecteerd met verschillende aflopende verdunningen van het virus om zodoende de optimale infectiedosis van het muis-geadapteerde virus te kunnen bepalen en tevens het model te karakteriseren.

##### **Type 4: Bepaling van dynamische bereik:**

Om de integriteit en vergelijkbaarheid van de influenzamodellen te bewaken lopen in alle vaccin-experimenten de volgende controlegroepen mee: *i*) antilichaamcontrole, die 100% bescherming geeft **10.2.g**  
*ii*) een PBS controle, die 0% bescherming geeft. Deze controles geven aan of het model binnen de verwachte bandbreedte werkt en maken het mogelijk om reeksen van experimenten en verschillende influenzamodellen met elkaar te vergelijken. In dit type experiment worden de controles voor de nieuwe muis-geadapteerde influenzastock eerst apart getest.

#### Deelproject C: Fundamentele kennis over de werkingsmechanismen van de vaccins

Doel van dit deelproject is om inzicht te krijgen in de werkingsmechanismen van de vaccins, m.a.w. welke onderdelen van het immuunsysteem worden door vaccinatie gestimuleerd. Deze kennis kan worden toegepast om vaccins verder te verbeteren.

Hiervoor zullen de volgende typen experimenten worden uitgevoerd: **Type 5: Aandeel antilichaam component:**

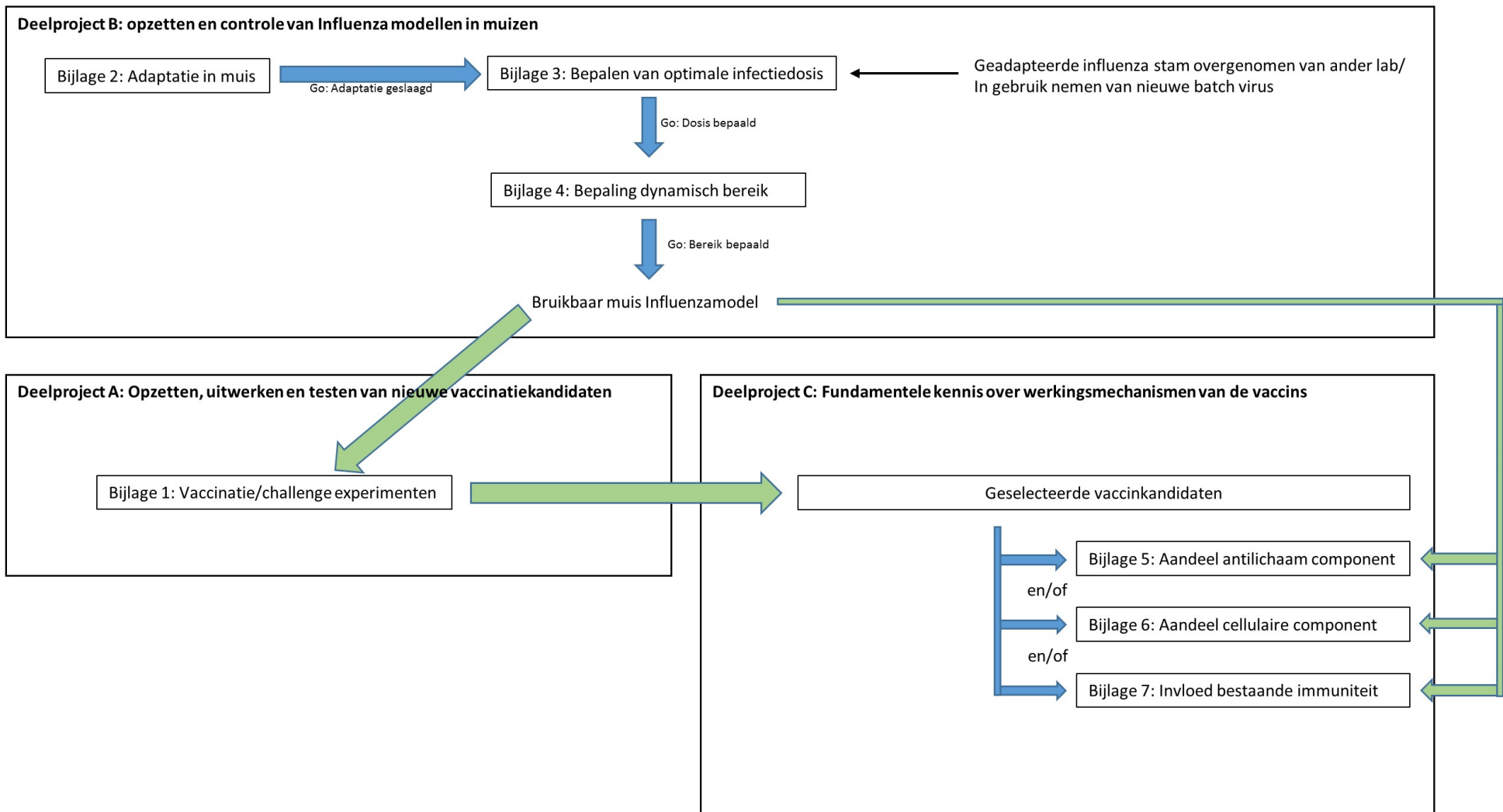
Om vast te stellen wat het aandeel is van de antilichamenrespons (humorale immuunsysteem) in de bescherming door het vaccin, wordt een tweedelig experiment uitgevoerd. In het eerste deel worden muizen geïmmuniseerd met de kandidaat vaccins en vervolgens verbleed om het serum te oogsten. Dit serum wordt in het tweede deel toegediend aan nieuwe, immunologisch naïeve muizen, die daarna met influenzavirus worden geïnfecteerd. De mate waarin de tweede groep muizen wordt beschermd is gerelateerd aan de door vaccinatie opgewekte antilichaamrespons.

**Type 6: Aandeel cellulaire component:**

Om vast te stellen wat het aandeel is van de cellulaire immuniteit in de bescherming na vaccinatie, wordt het volgende experiment uitgevoerd. Muizen worden gevaccineerd en vervolgens geïnfecteerd met influenzavirus. Net voor de infectie worden de dieren behandeld met antilichamen die specifiek componenten van het cellulaire immuunsysteem (b.v. CD4 of CD8 T cellen) uitschakelen. Het verschil in bescherming tussen de muizen die na vaccinatie wel en niet behandeld zijn met zo'n T cel antilichaam geeft het aandeel weer van het uitgeschakelde onderdeel van het cellulaire immuunsysteem.

**Type 7: Invloed bestaande immuniteit:**

Voor de selectie van geschikte vaccins worden deze eerst getest in muizen, die nooit eerder zijn blootgesteld aan influenza. Op deze wijze kan men de (kale) werking van een vaccin kandidaat in kaart brengen, alle immuniteit tegen influenza is namelijk te wijten aan de vaccinatie. Echter, als deze vaccins worden toegepast bij de mens, moet rekening worden gehouden met het feit dat de meeste mensen al bestaande immuniteit tegen influenzavirussen hebben, omdat ze vanaf jonge leeftijd jaarlijks in contact komen met verschillende influenza varianten. Deze bestaande immuniteit kan mogelijk storen bij vaccinatie: het maakt het vaccin onwerkzaam. Sterker nog, op theoretische gronden is het mogelijk geacht dat de combinatie van bestaande immuniteit en vaccinatie de ziekte veroorzaakt door een influenza infectie kan verergeren. Om deze effecten uit te sluiten, wordt een vaccinatie-challenge experiment uitgevoerd dit keer met muizen die al antistoffen tegen verschillende influenzavirussen hebben. Door bloedafname kan bekeken worden of de opbouw van antilichaamtiteren tegen het vaccinvirus normaal verloopt. De reactie op de challenge van muizen met pre-immunisatie wordt afgezet tegen die van muizen die geen bestaande immuniteit hadden.



### 3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

---

De vaccinatie/challenge experimenten zijn van belang om de optimale samenstellingen van vaccins of antivirale middelen, dosis, toedieningsroutes en aantal benodigde behandelingen te bepalen. Deze variabelen worden met elkaar vergeleken, waarna de meest effectieve wordt gebruikt in vervolggexperimenten. Hierdoor is het mogelijk om de vaccins en vaccinatiestrategieën op een systematische wijze te verbeteren. Dit werk wordt uitgevoerd in deelproject A (Opzetten, uitwerken en testen van nieuwe vaccinatietechnieken).

Om deze experimenten te kunnen uitvoeren zijn werkbare, reproduceerbare infectiemodellen nodig. In de afgelopen jaren is een breed panel van influenza muismodellen ontwikkeld. Zij hebben sindsdien hun waarde bewezen. We houden er rekening mee dat het nodig is om nieuwe influenza muismodellen op te zetten. Alle experimenten in deelproject B (Opzetten en controle van influenza modellen in muizen) spelen een rol in het verkrijgen en controleren van de influenza muismodellen. Deelproject C (Fundamentele kennis over de werkingsmechanismen van de vaccins) is bedoeld om inzicht te krijgen in de werkingsmechanismen van de vaccins, die voortkomen uit deelproject A. Deze kennis kan worden gebruikt om vaccinformuleringen te optimaliseren, zodat deze de voor bescherming belangrijke componenten van het immuunsysteem extra stimuleren.

### 3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

---

Serial number	Type of animal procedure
1	Vaccinatie/challenge experiment
2	Virusadaptatie in muis
3	Bepaling van infectiedosis
4	Bepaling van dynamische bereik influenzamodel
5	Aandeel antilichaam component
6	Aandeel cellulaire component
7	Invloed bestaande immuniteit

# 3a

## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Vaccinatie/challenge experiment</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Vaccinatie/challenge experiment
Serial number	Type of animal procedure					
1	Vaccinatie/challenge experiment					

## 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.

---

Een vaccinatie-challenge experiment is de standaard aanpak om de effectiviteit van vaccins te testen. Voor het testen van verbeterde/nieuwe influenzavaccins maken we gebruik van influenza muismodellen. Deze modellen hebben in het verleden hun waarde bewezen. In dit type experiment worden muizen gevaccineerd met verschillende kandidaat-vaccins, variërend in dosis, vaccinatieschema, en toedieningsroute in een toedieningsregime van 10.2.g. Drie tot vier weken na de laatste vaccinatie volgt een challenge met influenza virus. De reactie van de muizen op de challenge wordt gedurende 3 weken gevolgd. De experimenten zijn erop gericht om te bepalen wat de optimale en minimale werkzame dosis van het vaccin is, welke vaccinsamenstelling het meest effectief is, en wat het optimale aantal vaccinaties is.

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, overleving en klinische score.

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

---

Layout van typisch vaccinatie-challenge experiment:

- ca. 1 week acclimatiseren
- Bloedafname 10.2.g bij alle groepen een dag voor vaccinatie voor bepaling antilichaamtiter (preserum).
- Vaccinatie van testgroepen via 10.2.g i.
- D-1: Indien van belang voor experiment: Toediening van een positief controle antilichaam 10.2.g ( ) aan positieve model controlegroep en PBS aan negatieve controlegroep (zie opmerking 1). Bloedafname bij alle groepen voor bepalen antilichaamtiter.
- D0: Intranasale inoculatie van een vastgestelde dosis (zie experiment type 3) influenzavirus (zie opmerking 2), onder narcose.
- 10.2.g De muizen worden dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende score systeem gehanteerd:

10.2.g

Mocht blijken dat deze

observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Dieren, die voortijdig worden geëthanaseerd/dood gaan, worden ook nog gewogen.

- 10.2.g Einde proef: alle muizen worden geëthanaseerd. In sommige gevallen worden orgaan of bloedmonsters afgenomen voor analyse

#### Opmerking 1:

De toediening van positieve controle antilichaam, welke een 100% bescherming biedt tegen ziekte en sterfte, is bedoeld als modelcontrole en gouden standaard voor bescherming (en de brug naar voorgaande experimenten). Welk positief controle antilichaam wordt toegepast hangt af van welke influenzastam in de challenge gebruikt wordt. De PBS (de negatieve controle) en de toediening van antilichaam (de positieve controle) geven samen overzicht over het referentiekader van 0% tot 100% bescherming tegen lethale challenge met influenza virus. Zo wordt het gebruikte modelsysteem gecontroleerd op een correcte werking. Dit is niet mogelijk voor alle proefopzetten en opdrachtgevers, vanwege gebruiksrechten en het te testen vaccin.

#### Opmerking 2:

De toegediende influenzastam varieert, afhankelijk van het te testen vaccin en het stadium van onderzoek. In eerste instantie wordt het vaccin getest met een homologe challenge: de influenzastam is van hetzelfde type als het vaccin. Om te onderzoeken of het vaccin ook kruisbescherming levert, worden muizen gechallengeerd met een heterologe virusstam, die een andere typering heeft dan het vaccivirus. Op dit moment zijn er binnen het Instituut modellen voor een reeks aan influenzatypen beschikbaar, waaronder varianten van 10.2.g•

In dit type experimenten worden vaccins op de volgende punten geëvalueerd:

- Samenstelling: nieuwe vaccinkandidaten worden vergeleken met de standaarden (welke?) en de leidende vaccinkandidaten.
- Dosis: de optimale vaccindosis wordt bepaald door een reeks toedieningsdoses te testen.

Behandelfrequentie: ook het aantal benodigde toedieningen moet worden bepaald, dit varieert meestal van 1 tot 3 injecties. Tussen vaccinaties moet het immuunsysteem de tijd krijgen om de immuunreactie te laten "rijpen", in 99% van de experimenten wordt een interval van 3 of 4 weken gebruikt.

---

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

---

De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Voorafgaand aan elk experiment wordt eerst een statistische analyse gemaakt om de gewenste groepsgroottes te bepalen. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere doelstellingen in 1 experiment kunnen worden bekeken, zodat op controle groepen wordt bespaard. Bijvoorbeeld experiment type 1

(vaccinatie/challenge) wordt wanneer mogelijk gecombineerd met andere typen experimenten als b.v. 5 of 6 (aandeel antilichaam component of cellulaire component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controle groepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo kan het totale aantal gebruikte dieren binnen het project worden verminderd.

## **B. The animals**

---

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

---

**Diersoort:** Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF.

In dit project is de vergelijkbaarheid en reproduceerbaarheid van de uitgevoerde experimenten van groot belang. Om dit doel te behalen en om daarnaast het aantal muizen beperkt te houden wordt er naar gestreefd om de variatie zo klein mogelijk te houden. Hiertoe worden leeftijd en gewicht zo veel mogelijk gestandaardiseerd binnen de experimenten. In de wetenschappelijke literatuur worden duidelijke verschillen beschreven in de immuunrespons na influenzavirus infectie en vaccinatie bij vrouwelijke en mannelijke muizen. Hierbij spelen niet alleen hormonale (steroid) verschillen een rol, maar ook genetische verschillen tussen de geslachten (Avitsur, 2010;). Bij een directe vergelijking tussen mannelijke en vrouwelijke muizen in een influenza model blijkt dat het percentage morbiditeit en mortaliteit hoger is bij de vrouwtjes dan bij de mannetjes, mogelijk omdat in de vrouwtjes meer cytokine (TNF, CCL2) wordt geproduceerd (Klein, 2010; Robinson, 2011). Vrouwtjes zijn daardoor het gevoeligste meetsysteem in deze context.

- Avitsur R, Mays JW, Sheridan JF. (2010). Sex differences in the response to influenza virus infection: modulation by stress. *Horm Behav.* 59:257-64..
- Ingersoll MA (2017) Sex differences shape the response to infectious diseases. *PLoS Pathog* 13(12): e1006688
- Sabra L. Klein, Andrea Hodgson, and Dionne P. Robinson (2010). Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 92: 67-73.
- Markle JG, Fish EN. (2010). Sex matters in immunity. *Trends Immunol.* 35:97-104.
- Robinson DP, Lorenzo ME, Jian W, Klein SL. (2011). Elevated 17beta-estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. *PLoS Pathog.* 7(7):e1002149.



Om de onderlinge variatie tussen de proefdieren zo klein mogelijk te houden en daarmee het aantal benodigde proefdieren te verminderen, wordt gebruik gemaakt van één geslacht. Er is gekozen voor vrouwtjes, omdat die makkelijk in een groep kunnen worden gehuisvest, terwijl mannelijke muizen onderling vaak agressief gedrag vertonen en met elkaar kunnen gaan vechten. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere effectiviteit van de vaccins), verwondingen (die vaak geïnfecteerd raken, hetgeen een nadelig effect heeft op het immuunsysteem, etc) en zelfs sterfte (Laboratory Animals 1999 33:108-121; Anim. Behav. (1973) 21:788-795). Daarnaast blijft dit effect niet beperkt tot de mannetjes zelf, het blijkt dat als dit plaatsvindt binnen de geurdetectie van andere muizen, zowel mannetjes als vrouwtjes, dat stressniveau van deze dieren stijgt, met als gevolg meetbare variatie in de experimentele resultaten (Nature Methods 11(6):629-32)).

(Translationeel) vergelijkingsonderzoek zal op later tijdstip in ontwikkelingstraject worden uitgevoerd in andere diersoort dan muis (mens).

**Herkomst:** van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf.

**Geschatte aantallen:** aantal dieren per experiment varieert van 50 tot maximaal 300 dieren; per experiment wordt een onderbouwing gegeven van het aantal dieren en ter controle aangeboden bij de IvD. In eerste instantie zullen er voornamelijk experimenten van het type beschreven in bijlage 1 plaatsvinden, na verloop van tijd zal de vraagstelling meer verschuiven van de identificatie van geschikte vaccinkandidaten naar het ophelderen van het werkingsmechanisme van de gekozen kandidaten, hetgeen betekent dat meer proeven plaatsvinden zoals beschreven in bijlagen 5, 6 en 7. Inzichten verkregen aangaande werkingsmechanisme, kan hierna weer leiden naar verbeteringen in vaccins, die getest worden in vaccinatie/challenge experimenten beschreven in bijlage 1. Er wordt er naar gestreeft om zoveel mogelijk experimenten van type 1, 5, 6 en 7 met elkaar te combineren als dit opportuun is, om zodoende o.a. te besparen op het aantal dieren dat wordt gebruikt in de controlegroepen. Om deze reden wil de onderzoeker het aantal dieren voor bijlagen 1, 5, 6 en 7 samenvoegen en als een groep aanvragen. Het aantal proeven in gehele project is 20 tot maximaal 30 proeven per jaar en het maximale aantal dieren per proef is 200 tot maximaal 300, het maximale aantal dieren is 9000 dieren per jaar. Dat is dan voor totale duur van 5 jaar voor deze aanvraag: een maximaal aantal van  $5 \times 9000 = 45.000$  dieren. Op basis van ervaring is de inschatting dat ca. 60-70% van alle uitgevoerde experimenten uit dit type experiment zal bestaan, dat betekent dat tussen ca. 27000-31500 dieren in dit type experiment worden benut over de totale looptijd van deze aanvraag. Een precieze inschatting valt op voorhand niet te maken, daar de resultaten van experimenten die nog moeten worden uitgevoerd aan de basis staan van de opvolgende experimenten. Voor elk individueel experiment zal een onderbouwing van het aantal dieren worden gegeven in de experimentaanvraag.

**Levensstadia:** muizen van ca. 6 weken leeftijd.

---

**C. Re-use**

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

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

---

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

---

No

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

---

---

**D. Replacement, reduction, refinement**

---

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

---

Vervanging: door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een vaccin, antiviraal middel of virus niet gesimuleerd kan worden. Vermindering: Voordat influenzavaccins worden getest in dieren, worden ze eerst uitvoerig getest in het lab; alleen de meest veelbelovende vaccinkandidaten zullen worden getest in dieren. Hierna wordt het aantal benodigde dieren in de experimenten uitvoerig statistisch doorgerekend, om het aantal dieren te beperken, maar tegelijkertijd wel zekerheid te krijgen dat de gegevens die uit het experiment komen bruikbaar zijn om conclusies uit te trekken (en om zo te voorkomen dat experimenten herhaald moeten worden). De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen

op de challenge infectie. Voor een experiment wordt gedaan wordt eerst een statistische analyse gemaakt om de groepsgroottes te bepalen. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere vragen in 1 experiment kunnen worden beantwoord, zodat op controlegroepen bespaard kan worden. Bijvoorbeeld: experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt gecombineerd met type experiment 5 of 6 (aandeel antilichaam component of aandeel cellulaire component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controlegroepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo is het mogelijk om het totaal aantal gebruikte dieren binnen het project te verminderen. Verfijning: De data gegenereerd in de experimenten worden uitvoerig statistisch geanalyseerd. Er worden voortdurend interstudie-analyses en trendanalyses over de verschillende experimentreeksen uitgevoerd om het inzicht in de muismodellen te vergroten en de waargenomen vaccineffecten te kunnen interpreteren. De uitkomsten van deze analyses spelen een belangrijke rol bij het ontwerp van vervollexperimenten. Om deze reden is de noodzaak groot om de variatie binnen en tussen experimenten zo veel mogelijk te beperken. Hierom worden alleen vrouwelijke dieren gebruikt binnen deze experimenten.

---

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

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren. - De muizen worden onder narcose gebracht voor intranasale toediening van virus . - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), [10.2.g](#)  
ij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. - Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in gespecialiseerde dierfaciliteit [10.2.g](#).

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

De vaccins die worden getest zijn over het algemeen bedacht, geproduceerd en gepatenteerd door de opdrachtgever/onderzoekspartner. Deze vaccins zijn ook niet in het bezit van anderen. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat andere partijen precies dezelfde experimenten hebben uitgevoerd. Het komt wel voor dat een bestaand vaccin wordt meegenomen in het experiment ter vergelijking met de nieuwe kandidaatvaccins. Daarnaast volgen de onderzoekers die bij dit project betrokken zijn de wetenschappelijke literatuur.

## 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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de gevaccineerde muizen worden na virus challenge.

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?

---

De muizen kunnen ziek worden, met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte. Verder ondervinden ze ongerief van een aantal experimentele handelingen: -Bloedafnames, d.m.v. 10.2.g per keer - Vaccingroepen (inclusief de PBS negatieve controle): i.m. 10.2.g - Antilichaam 10.2.g of equivalent die 100% bescherming genereert) behandeling controlegroepen: 10.2.g Alle groepen: 10.2.g toediening influenzavirus onder narcose

Explain why these effects may emerge.

---

De muizen ontwikkelen een pneumonie t.g.v. de influenzavirus infectie. Experimentele handelingen zijn noodzakelijk voor toediening van de testsubstantie (virus/vaccin/antilichaam/antiviraal middel) en afname van bloedmonsters.

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

---

- De dieren worden onder narcose gebracht voor intranasale toediening van het virus. - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A). Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Mocht blijken dat deze observatie/controler frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

### **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), waarbij 10.2.g

Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (=HEP). De tijdsduur van de fase waarin muizen een score 4 krijgen is over het algemeen kort.

Indicate the likely incidence.

In de ongevaccineerde negatieve modelcontrole groep (PBS): 80-100% en in de gevaccineerde groepen: gemiddeld 30%. Er zijn soms vaccins die minder goed werken dan verwacht, dan reageren de dieren in het ergste geval bijna gelijk aan ongevaccineerde dieren. Er zijn ook vaccins die perfect beschermen, waardoor de dieren helemaal geen ongerief ondervinden van de influenza infectie. De antilichaam behandelde modelcontrole dieren: 0% kans: het antilichaam geeft volledige bescherming.

#### **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 ).

De ongevaccineerde controle dieren ondervinden de nadeligste effecten van de influenza infectie: ernstig; Gevaccineerde dieren tonen meer variatie, maar over het algemeen worden de dieren op zijn minst deels beschermd: licht tot matig, maar bij uitblijven van bescherming door vaccinatie kan het ernstig zijn; Antilichaam behandelde positieve controle groep: licht. Geschatte Cumulatief ongerief: - Ernstig: 6.300 (20%), over de gehele looptijd van 5 jaar; - Matig: 18.900 (60%), over de gehele looptijd van 5 jaar; - Licht: 6.300 (20%), over de gehele looptijd van 5 jaar. Bij de inschatting is uitgegaan van maximale inzet van het aantal aangevraagde dieren (30 experimenten per jaar x 300 dieren per experiment x 5 jaar looptijd, waarvan 70% van de dieren van de pool in type 1 experimenten worden ingezet). De reële aantallen en het reële ongerief zijn afhankelijk van grootte van het experiment\*, grootte van de diergroepen\*, effectiviteit van de geteste vaccins, etc. (\*= worden bij planning van experimenten bepaald m.b.v. statistische toetsing).

## **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

**L. Method of killing**

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

---

Bij deel van experimenten worden organen (b.v. milt, lymfeknopen, lever, hersenen) en/of bloedvolume van muis gemonsterd voor analyse, deze bemonstering is niet verenigbaar met het in leven laten van de dieren. In de overige gevallen zijn de dieren vanwege de veranderde immuunstatus en blootstelling aan een infectieus agens niet opnieuw te gebruiken en zullen de dieren worden geëuthanaseerd om de proef te beëindigen.

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

---

# 3b

## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Virusadaptatie in muis</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Virusadaptatie in muis
Serial number	Type of animal procedure					
2	Virusadaptatie in muis					



## 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.

---

In de zoektocht naar vaccins tegen influenza is het noodzakelijk om diermodellen te hebben om de kandidaatvaccins te kunnen testen. Bescherming door een vaccin tegen de ene influenzastam garandeert geen bescherming tegen een andere influenzastam. Om deze reden moet de effectiviteit van deze vaccins tegen verschillende stammen getest worden om inzicht te krijgen in de breedte (de hoeveelheid verschillende influenza stammen) van de bescherming. Hiervoor maken we gebruik van influenza infectiemodellen in de muis. Vaak moeten influenzavirussen eerst aan muizen worden aangepast, voordat ze bij muizen een klinische infectie veroorzaken. Smirnov *et al.* (2000) beschrijven dat ze 23 long-long passages nodig hadden om een pneumovirulente stam te produceren. Brown *et al.* (2001) hadden 20 passages nodig voor adaptatie van een H3N2 stam. Anderen geven echter aan dat met sommige stammen ook al na 5-10 passages adaptatie kan zijn bereikt. Eerder [10.2.g](#)

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, klinische score, virustiters in de longen.

#### Referenties:

- Smirnov YA, Lipatov AS, Van Beek R, Gitelman AK, Osterhaus AD, Claas EC (2000). Characterization of adaptation of an avian influenza A (H5N2) virus to a mammalian host. *Acta Virol.* 44:1-8.
- E. G. Brown, H. Liu, L. Chang Kit, S. Baird & M. Nesrallah (2001). Pattern of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: Identification of functional themes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6883-6888.

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

---

Lay-out van typisch adaptatie experiment:

Twee groepen van elk 3 muizen worden intranasaal geïnfecteerd met twee virusverduningen. Na 3-5 dagen (afhankelijk van de influenzastam) worden de muizen geëuthanaseerd en worden de longen verzameld. Het longmateriaal wordt in het lab gebruikt om het inoculum voor passage 2 te prepareren en passage 1 te titreren. Daarna wordt een tweede set muizen geïnfecteerd met 50 µl virusmateriaal geïsoleerd uit de longen van de voorgaande infectie. Na 3-5 dagen worden de muizen geëuthanaseerd en worden de longen verzameld. Het longmateriaal wordt in het lab gebruikt om het inoculum voor passage 3 te prepareren. Ook wordt de virustiter van passage 2 bepaald, etc.. Op het moment dat de eerste klinische verschijnselen optreden, zal een extra set van 3 muizen worden geïnfecteerd. Deze muizen worden gedurende 10-14 dagen gevolgd om te zien in welke mate de dieren ziek worden/of het virus al aan de muis is aangepast.

De muizen worden dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld volgens het volgende score systeem [10.2.g](#)

Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen.

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

Er worden 2 parallele passages (elk 3 dieren) uitgevoerd, waarbij met 2 verschillende doses wordt gestart, omdat een geslaagde adaptatie afhankelijk kan zijn van de initiële dosis. Elke groep bestaat uit 3 dieren, zodat de kans dat virus aanslaat niet van het individuele dier afhangt. Er wordt gestreefd naar zo gering mogelijk aantal passages, om het aantal mutaties t.o.v. het uitgangsvirus zo veel mogelijk te beperken.

## B. The animals

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

**Diersoort:** Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF.

In dit project is de vergelijkbaarheid en reproduceerbaarheid van de uitgevoerde experimenten van groot belang. Om dit doel te behalen en om daarnaast het aantal muizen beperkt te houden wordt er naar gestreefd om de variatie zo klein mogelijk te houden. Hiertoe worden leeftijd en gewicht zo veel mogelijk gestandaardiseerd binnen de experimenten. In de wetenschappelijke literatuur worden duidelijke verschillen beschreven in de immuunrespons na influenzavirus infectie en vaccinatie bij vrouwelijke en mannelijke muizen. Hierbij spelen niet alleen hormonale (steroid) verschillen een rol, maar ook genetische verschillen tussen de geslachten (Avitsur, 2010;). Bij een directe vergelijking tussen mannelijke en vrouwelijke muizen in een influenza model blijkt dat het percentage morbiditeit en mortaliteit hoger is bij de vrouwtjes dan bij de mannetjes, mogelijk omdat in de vrouwtjes meer cytokine (TNF, CCL2) wordt geproduceerd (Klein, 2010; Robinson, 2011). Vrouwtjes zijn daardoor het gevoeligste meetsysteem in deze context.

- Avitsur R, Mays JW, Sheridan JF. (2010). Sex differences in the response to influenza virus infection: modulation by stress. *Horm Behav.* 59:257-64..
- Ingersoll MA (2017) Sex differences shape the response to infectious diseases. *PLoS Pathog* 13(12): e1006688
- Sabra L. Klein, Andrea Hodgson, and Dionne P. Robinson (2010). Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 92: 67-73.

- Markle JG, Fish EN. (20103). SeXX matters in immunity. Trends Immunol. 35:97-104.
- Robinson DP, Lorenzo ME, Jian W, Klein SL. (2011). Elevated 17beta-estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. PLoS Pathog. 7(7):e1002149.

Om de onderlinge variatie tussen de proefdieren zo klein mogelijk te houden en daarmee het aantal benodigde proefdieren te verminderen, wordt gebruik gemaakt van één geslacht. Er is gekozen voor vrouwtjes, omdat die makkelijk in een groep kunnen worden gehuisvest, terwijl mannelijke muizen onderling vaak agressief gedrag vertonen en met elkaar kunnen gaan vechten. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere effectiviteit van de vaccins), verwondingen (die vaak geïnfecteerd raken, hetgeen een nadelig effect heeft op het immuunsysteem, etc) en zelfs sterfte (Laboratory Animals 1999 33:108-121; Anim. Behav. (1973) 21:788-795). Daarnaast blijft dit effect niet beperkt tot de mannetjes zelf, het blijkt dat als dit plaatsvindt binnen de geurdetectie van andere muizen, zowel mannetjes als vrouwtjes, dat stressniveau van deze dieren stijgt, met als gevolg meetbare variatie in de experimentele resultaten (Nature Methods 11(6):629-32)).

(Translationeel) vergelijkingsonderzoek zal op later tijdstip in ontwikkelingstraject worden uitgevoerd in andere diersoort dan muis (mens).

**Herkomst:** van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf.

**Geschatte aantallen:** Afhankelijk van de behoefte aan nieuwe influenza modellen vanuit het veld, op dit moment wordt verwacht maximaal gemiddeld aantal 2 studies per jaar met gemiddeld 20 passages in meest voorkomende vorm (zoals beschreven onder de kop A. Experimental Approach, 2 Animal Procedures) bestaande uit 6 dieren (2x3) per passage en 1 extra sets van 3 dieren: ca. 246 dieren/jaar. Over de gehele looptijd van 5 jaar is dat:  $5 \times 246 = 1.246$  dieren. Verdeling van deze dieren over totale project zal niet evenredig over de jaren zijn, het ene jaar kunnen er 4 modellen worden opgezet, terwijl het jaar daarop helemaal geen nieuwe modellen worden opgezet.

**Levensstadia:** muizen van ca. 6-8 weken leeftijd.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

---

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

---

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

---

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

---

Vervanging: Door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een virus niet gesimuleerd kan worden. Vermindering: Het experiment wordt uitgevoerd met een klein aantal dieren, maar de ervaring leert dat het voldoende is om een succesvolle adaptatie te kunnen uitvoeren en telkens voldoende longmateriaal te kunnen oogsten voor de volgende passage. Bij elke passage neemt de kans op mutaties in het genoom van het influenza virus toe. Om zo dicht mogelijk bij het originele virus te blijven, wordt het aantal passages in muizen, en daarmee ook het aantal benodigde dieren, zo laag mogelijk gehouden. Verfijning: Door ervaringen uit voorgaande adaptatie experimenten, met name t.a.v. de vereiste initiële dosis, is de kans op een succesvolle, snelle adaptatie sterk toegenomen.

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

---

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren. - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem, waarin 10.2.g  
Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. - Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in 10.2.g.

## **Repetition and Duplication**

#### **E. Repetition**

---

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

---

De wetenschappelijke literatuur op dit onderwerp wordt gevolgd door de bij dit project betrokken wetenschappers. Als blijkt dat de benodigde influenza virusstam elders al is geadapteerd, wordt deze opgevraagd. Dit heeft de voorkeur (en in het verleden is zo'n muis-geadapteerde virusstam ook bij collega's opgevraagd), omdat het zekerheid geeft dat een bruikbaar model kan worden verkregen en ook omdat het minder dieren en minder tijd kost.

## 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?

---

## H. Pain and pain relief

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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag: (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen worden na toediening van het virus.

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?

- Muisen kunnen ziek worden, met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte.
- De muizen worden onder narcose gebracht voor intranasale toediening van het virus.

Explain why these effects may emerge.

Dit is het gevolg van de infectie met influenzavirus en de experimentele handelingen.

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

De meeste muizen worden al geëuthanaseerd (op dag 3-5 p.i.) voordat (ernstige) klinische verschijnselen optreden. Verderop in het adaptatieproces wordt een set van 3 muizen langere tijd gevolgd om juist te zien wat de gevolgen van de infectie met het virus uit de betreffende passage zijn. In deze periode worden de dieren dagelijks klinisch beoordeeld volgens bovenstaand scoresysteem (zie onder A). Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

## J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Muizen die langere tijd worden gevolgd (zie onder I) kunnen ernstige klinische verschijnselen ontwikkelen. Ze worden geëuthanaseerd bij score 4 = 10.2.g

De tijdsduur van de fase waarin muizen een score 4 krijgen is over het algemeen kort.

Indicate the likely incidence.

Het gaat waarschijnlijk om 1 of 2 sets van 3 muizen per adaptatie, want alleen bij de laatste ronde van het adaptatie proces zal virus virulent zijn in de muis. Totale maximale aantal muizen over looptijd van 5 jaar: 10 adaptaties, 2 sets van 3 muizen=  $10 \times 2 \times 3 = 60$  muizen.

### **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 ).

Geschatte Cumulatieve ongerief: Gering: 1.156 Matig: 30 Ernstig: 60 Voor de schatting is er van uitgegaan dat maximale aantal adaptaties (10 stuks) met gemiddeld aantal passages (20x) plaatsvind.

## **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Het oogsten van de longen voor isolatie van het virus is noodzakelijk voor het in handen krijgen van het geadapteerde virus, deze bemonstering is niet verenigbaar met het in leven laten van de dieren.

| 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

---



# 3c

## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>3</td><td>Bepaling van infectiedosis</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	3	Bepaling van infectiedosis
Serial number	Type of animal procedure					
3	Bepaling van infectiedosis					

## 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.

---

Na de adaptatie van het virus aan de muis (experiment type 2) is het nodig om de optimale infectiedosis van het geadapteerde virus in de muis te bepalen. Deze bepaling is ook nodig bij de overgang van een oude (uitgeputte) voorraad virus naar een nieuw-geproduceerde voorraad om te bepalen of de karakteristieken van het model (door mutaties in het virus tijdens de productie van de nieuwe stock) wel/niet zijn veranderd en vast te stellen dat de experimenten die zijn uitgevoerd met de oude voorraad vergelijkbaar zijn met die van de nieuwe voorraad.

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, overleving en klinische score.

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

---

Layout van typisch dosis-bepaling experiment

#### Deelexperiment 1: Dosis reeks bepaling

- 1 week acclimatiseren
- Op 10<sup>2</sup> worden de muizen, 5 of 6 groepen, 5 dieren per groep, intranasaal geïnoculeerd met verschillende oplopende concentraties influenzavirus. Daarvoor worden de dieren eerst onder narcose gebracht.
- Vanaf 10<sup>2.9</sup> worden de muizen dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende score systeem gehanteerd: 10<sup>2.9</sup>

- Dieren, die voortijdig worden geëthanaseerd/ dood gaan, worden eerst gewogen en dan naar het lab gestuurd. Daar zal worden gekeken of de longen zijn aangetast.

- Op 10<sup>2.9</sup> worden de overgebleven muizen geëthanaseerd en verbloed.

Dit experiment is valide als in de reeks zowel 100% als 0% overleving geobserveerd is, als aan dit criterium niet voldaan is, moet dosis reeks worden aangepast en het experiment overgedaan worden.

#### Deelexperiment 2: Vaststelling van virale infectiedosis

- 1 week acclimatiseren
  - Op <sup>10.2.g</sup> worden de muizen, 5-6 groepen, 10 dieren per groep, intranasaal geïnoculeerd met verschillende oplopende verdunningen <sup>10.2.g</sup> influenzavirus. Daarvoor worden de dieren eerst onder narcose gebracht.
  - Vanaf <sup>10.2.g</sup> worden de muizen dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende score systeem gehanteerd: <sup>10.2.g</sup>
- Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen.
- Dieren, die voortijdig worden geëuthanaseerd/ dood gaan, worden eerst gewogen en dan naar het lab gestuurd. Daar zal worden gekeken of de longen zijn aangetast.
  - Op <sup>10.2.g</sup> worden de overgebleven muizen geëuthanaseerd en verbloed.

---

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

---

Bij een nieuw influenza-muismodel is nog volledig onbekend wat de uiterste grenzen zijn van de virusdoses waarbij een duidelijk ziektebeeld te zien is in de muis. In het eerste deelexperiment wordt uitgezocht wat de uiterste virus doses zijn, oftewel bij welke dosis 100% en 0% overleving geobserveerd wordt.

Dan volgt deelexperiment 2 waarin het doel de vaststelling van de juiste Influenza infectiedosis is. De infectiedosis tussen alle influenza muismodellen worden zo goed als mogelijk gestandaardiseerd om de vergelijkbaarheid tussen verschillende modellen te maximaliseren.

<sup>10.2.g</sup> afhankelijk van de titer van de muis-geadapteerde virusstock kan met 5 of 6 groepen een sigmoïde responscurve worden verkregen, waarbij in het beste geval een plateau optreedt bij 0 en 100% overleving. Met 10 dieren per groep kan 10% verschil (=1 muis) in reactiviteit tussen de groepen worden gevonden. Het is gebleken dat op deze manier zijn dat meestal met één dosistitratie experiment (per virus) kan worden volstaan.

## **B. The animals**

---

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

---

---

**Diersoort:** Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF.

In dit project is de vergelijkbaarheid en reproduceerbaarheid van de uitgevoerde experimenten van groot belang. Om dit doel te behalen en om daarnaast het aantal muizen beperkt te houden wordt er naar gestreefd om de variatie zo klein mogelijk te houden. Hiertoe worden leeftijd en gewicht zo veel mogelijk gestandaardiseerd binnen de experimenten. In de wetenschappelijke literatuur worden duidelijke verschillen beschreven in de immuunrespons na influenzavirus infectie en vaccinatie bij vrouwelijke en mannelijke muizen. Hierbij spelen niet alleen hormonale (steroid) verschillen een rol, maar ook genetische verschillen tussen de geslachten (Avitsur, 2010;). Bij een directe vergelijking tussen mannelijke en vrouwelijke muizen in een influenza model blijkt dat het percentage morbiditeit en mortaliteit hoger is bij de vrouwtjes dan bij de mannetjes, mogelijk omdat in de vrouwtjes meer cytokine (TNF, CCL2) wordt geproduceerd (Klein, 2010; Robinson, 2011). Vrouwtjes zijn daardoor het gevoeligste meetsysteem in deze context.

- Avitsur R, Mays JW, Sheridan JF. (2010). Sex differences in the response to influenza virus infection: modulation by stress. *Horm Behav.* 59:257-64..
- Ingersoll MA (2017) Sex differences shape the response to infectious diseases. *PLoS Pathog* 13(12): e1006688
- Sabra L. Klein, Andrea Hodgson, and Dionne P. Robinson (2010). Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 92: 67-73.
- Markle JG, Fish EN. (2010). Sex matters in immunity. *Trends Immunol.* 35:97-104.
- Robinson DP, Lorenzo ME, Jian W, Klein SL. (2011). Elevated 17beta-estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. *PLoS Pathog.* 7(7):e1002149.

Om de onderlinge variatie tussen de proefdieren zo klein mogelijk te houden en daarmee het aantal benodigde proefdieren te verminderen, wordt gebruik gemaakt van één geslacht. Er is gekozen voor vrouwtjes, omdat die makkelijk in een groep kunnen worden gehuisvest, terwijl mannelijke muizen onderling vaak agressief gedrag vertonen en met elkaar kunnen gaan vechten. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere effectiviteit van de vaccins), verwondingen (die vaak geïnfecteerd raken, hetgeen een nadelig effect heeft op het immuunsysteem, etc) en zelfs sterfte (*Laboratory Animals* 1999 33:108-121; *Anim. Behav.* (1973) 21:788-795). Daarnaast blijft dit effect niet beperkt tot de mannetjes zelf, het blijkt dat als dit plaatsvindt binnen de geurdetectie van andere muizen, zowel mannetjes als vrouwtjes, dat stressniveau van deze dieren stijgt, met als gevolg meetbare variatie in de experimentele resultaten (*Nature Methods* 11(6):629-32)).

(Translationeel) vergelijkingsonderzoek zal op later tijdstip in ontwikkelingstraject worden uitgevoerd in andere diersoort dan muis (mens).

**Herkomst:** van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf

**Geschatte aantallen:** Afhankelijk van de behoefte aan nieuwe influenza modellen vanuit het veld en mogelijke ingebruikname van nieuwe modellen. Deel experiment 1, max. aantal dieren per experiment: 30, deelexperiment 2, max. aantal dieren per experiment: 60. Geschatte maximale aantal experimenten per jaar: deelexperiment 1: 3 en deelexperiment 2: 3, geschatte maximale aantal dieren/jaar:  $(3 \times 30) + (3 \times 60) = 270$  dieren, voor gehele looptijd van 5 jaar: 1.350 dieren.

**Levensstadia:** muizen van ca. 6 weken leeftijd. In sommige gevallen wordt het experiment ook uitgevoerd met oudere muizen (12+ weken), om leeftijdseffecten uit te sluiten/controleren.

### C. Re-use

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

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

---

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

---

No

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

---

### D. Replacement, reduction, refinement

---

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

---

Vervanging: Door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een virus infectie niet gesimuleerd kan worden. Vermindering: Op basis van eerdere resultaten kan worden verwacht dat het aantal gebruikte proefdieren en dosisgroepen voldoende is, maar niet disproportioneel, om in tweetal deelexperimenten te bepalen welke dosis moet worden gebruikt voor challenge in vervolgstudies met reproduceerbare resultaten. Om te voorkomen dat frequent nieuwe batches van een muis-geadapteerd virus in muizen moeten worden getest, worden steeds stocks geproduceerd die voldoende zijn voor minstens 5 jaar experimenteel onderzoek. Verfijning: Het influenza muismodel is in de wetenschappelijke wereld geaccepteerd als geschikt model voor het testen van vaccins en antivirale middelen voor toepassing in de mens in de eerste fase van het onderzoek. De ervaring met dit type experimenten heeft geleerd welke dosisreeks het beste kan worden getest om voor het vervolgonderzoek direct bruikbare resultaten op te leveren.

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

---

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren. - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem, waarin 3 = 10.2.g  
Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. - Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in 10.2.g.

## 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.

---

In geval van overgang naar een nieuwe virusstock alsmede bij implementatie van een infectiemodel dat van derden afkomstig is, wordt (opnieuw) een dosis-respons experiment uitgevoerd (zie onder A).

## 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?

---

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

---

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.

---

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen worden van de toegediende dosis virus.

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?

---

- Muizen worden meer of minder ernstig ziek met verschijnselen van algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen

en in het ernstigste geval sterfte. - Muizen ondervinden daarnaast ongerief van de experimentele handelingen: intranasale toediening van het virus onder anesthesie.

Explain why these effects may emerge.

---

Ziekte is het gevolg van de influenza infectie en afhankelijk van de toegediende virusdosis. En experimentele handelingen.

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

---

- Voor de intranasale toediening van virus worden de muizen eerst onder narcose gebracht. - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens het bovenstaand scoresysteem (zie onder A). Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

#### **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem, waarin 10.2.g

Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (= HEP). De tijdsduur van de fase waarin muizen een score 4 krijgen is over het algemeen kort.

---

Indicate the likely incidence.

---

Naarmate de dosis virus hoger is, zal het ongerief dat de dieren ondervinden toenemen. In de 1 of 2 groepen blootgesteld aan de hoogste doses gaat het om 90-100% van de dieren in experimentele groep die de HEP bereiken. Bij lagere doses zal dit percentage evenredig meer of minder sterk afnemen, afhankelijk van de virusstam. In de laagste dosisgroep kan matig tot ernstig ongerief worden verwacht bij 0-20% van de dieren.

#### **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 ).

---



Dieren, die de hoogste dosis virus krijgen toegediend, ondervinden de nadeligste effecten van de influenzavirus infectie: ernstig. Bij lagere virusdoses zal de mate van ongerief afnemen tot licht. Het is niet goed te voorspellen bij welke dosis de omslag van ernstig naar matig ongerief ligt. 80% (bij maximale aantal dieren 1350: 1080) van de dieren: Matig ongerief, 20% (bij maximale aantal dieren 1350:270) van de dieren: Ernstig ongerief. Beiden voor gehele looptijd van 5 jaar.

## End of experiment

### L. Method of killing

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

Overlevende dieren worden aan het einde van de proef geëuthanaseerd, hergebruik binnen dit project is uitgesloten omdat de immuunstatus van de dieren door blootstelling aan influenzavirus is veranderd. Deze influenzavirussen zijn ook besmettelijk voor mensen.

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

---

# 3d

## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 4	Type of animal procedure Bepaling van dynamische bereik influenzamodel

## 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.

---

Dit type experiment is bedoeld om te controleren of het infectiemodel met de nieuw verkregen, muis-geadapteerde influenzastock (geproduceerd in experiment type 2) zich volgens verwachting "gedraagt" na toediening van een antilichaam met virus-neutraliserende eigenschappen. Daartoe worden muizen voor de challenge behandeld met een antilichaam dat 100% bescherming geeft of met PBS, waarna 0% bescherming optreedt. Deze behandelgroepen lopen in alle vaccinatie/challenge experimenten als controles mee om de integriteit van de influenzamodelen te bewaken en een vergelijking van de gegevens uit verschillende experimenten mogelijk te maken.

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

---

Lay-out van typische bepaling van dynamische bereik:

1 week acclimatiseren

Op 10.2.g worden 2 groepen met 8 tot 10 dieren (aantal dieren per groep hangt af van virulentie van de gebruikte influenza stam), behandeld met antilichaam (10.2.g

Twee andere groepen met elk eveneens 8 tot 10 dieren worden behandeld met PBS.

- Op 10.2.g worden 1 antilichaam behandelde groep en 1 PBS behandelde groep intranasaal geïnoculeerd (onder narcose) met hoge concentratie influenza virus 10.2.g De andere antilichaam behandelde en PBS behandelde groep krijgt een lage concentratie influenza virus toegediend. De hoge concentratie en de lage concentratie zijn de twee gestandaardiseerde influenza doses die worden toegepast in alle experimenten.
- Vanaf 10.2.g worden de muizen dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende score systeem gehanteerd: 10.2.g
- . Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.
- Op 10.2.g worden de overgebleven muizen geëuthanaseerd.

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

---

I 10.2.g 100% bescherming na antilichaambehandeling en 0% bescherming na PBS behandeling). Aantal dieren per groep wordt bepaald aan de hand van de data, die voortkomen uit de "optimale dosisbepaling" (type 3).

## B. The animals

---

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

---

**Diersoort:** Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF.

In dit project is de vergelijkbaarheid en reproduceerbaarheid van de uitgevoerde experimenten van groot belang. Om dit doel te behalen en om daarnaast het aantal muizen beperkt te houden wordt er naar gestreefd om de variatie zo klein mogelijk te houden. Hiertoe worden leeftijd en gewicht zo veel mogelijk gestandaardiseerd binnen de experimenten. In de wetenschappelijke literatuur worden duidelijke verschillen beschreven in de immuunrespons na influenzavirus infectie en vaccinatie bij vrouwelijke en mannelijke muizen. Hierbij spelen niet alleen hormonale (steroid) verschillen een rol, maar ook genetische verschillen tussen de geslachten (Avitsur, 2010;). Bij een directe vergelijking tussen mannelijke en vrouwelijke muizen in een influenza model blijkt dat het percentage morbiditeit en mortaliteit hoger is bij de vrouwtjes dan bij de mannetjes, mogelijk omdat in de vrouwtjes meer cytokine (TNF, CCL2) wordt geproduceerd (Klein, 2010; Robinson, 2011). Vrouwtjes zijn daardoor het gevoeligste meetsysteem in deze context.

- Avitsur R, Mays JW, Sheridan JF. (2010). Sex differences in the response to influenza virus infection: modulation by stress. *Horm Behav.* 59:257-64..
- Ingersoll MA (2017) Sex differences shape the response to infectious diseases. *PLoS Pathog* 13(12): e1006688
- Sabra L. Klein, Andrea Hodgson, and Dionne P. Robinson (2010). Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 92: 67-73.
- Markle JG, Fish EN. (2010). Sex matters in immunity. *Trends Immunol.* 35:97-104.

- Robinson DP, Lorenzo ME, Jian W, Klein SL. (2011). Elevated 17beta-estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. PLoS Pathog. 7(7):e1002149.

Om de onderlinge variatie tussen de proefdieren zo klein mogelijk te houden en daarmee het aantal benodigde proefdieren te verminderen, wordt gebruik gemaakt van één geslacht. Er is gekozen voor vrouwtjes, omdat die makkelijk in een groep kunnen worden gehuisvest, terwijl mannelijke muizen onderling vaak agressief gedrag vertonen en met elkaar kunnen gaan vechten. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere effectiviteit van de vaccins), verwondingen (die vaak geïnfecteerd raken, hetgeen een nadelig effect heeft op het immuunsysteem, etc) en zelfs sterfte (Laboratory Animals 1999 33:108-121; Anim. Behav. (1973) 21:788-795). Daarnaast blijft dit effect niet beperkt tot de mannetjes zelf, het blijkt dat als dit plaatsvindt binnen de geurdetectie van andere muizen, zowel mannetjes als vrouwtjes, dat stressniveau van deze dieren stijgt, met als gevolg meetbare variatie in de experimentele resultaten (Nature Methods 11(6):629-32)).

(Translationeel) vergelijkingsonderzoek zal op later tijdstip in ontwikkelingstraject worden uitgevoerd in andere diersoort dan muis (mens).

**Herkomst:** van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf

**Geschatte aantallen:** Afhankelijk van de behoefte aan nieuwe influenza modellen vanuit het veld en implementatie van modellen. Max. 40 dieren per experiment; Geschat maximaal 3 studies per jaar met maximaal 40 dieren per experiment, Geschatte maximale aantal dieren: 120 dieren/jaar; Over de gehele looptijd van 5 jaar: 600 dieren.

### C. Re-use

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

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

---

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

---

No

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

---

## D. Replacement, reduction, refinement

---



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

---

Vervanging: Door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een virus infectie niet gesimuleerd kan worden. Vermindering: Op basis van eerdere resultaten kan worden verwacht dat het aantal gebruikte proefdieren en dosisgroepen voldoende is, maar niet disproportioneel, om in één experiment te bepalen of de 0% en 100% beschermingscontroles (=definitie dynamisch bereik) aan de verwachting voldoen. Verfijning: Het influenza muismodel is in de wetenschappelijke wereld geaccepteerd als geschikt model voor het testen van vaccins en antivirale middelen voor toepassing in de mens in de eerste fase van het onderzoek. Binnen het instituut wordt al meer dan tien jaar intensief gewerkt met influenza muismodellen, waarvan de meesten binnen het instituut zijn ontwikkeld. We hebben deze modellen in het beginstadium uitgebreid geëvalueerd en zo goed mogelijk gestandaardiseerd en zijn nu in staat om consistente uitkomsten te produceren.

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

---

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren. - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem, waarin <sup>10.2.g</sup>  Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. - Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in <sup>10.2.g</sup> .

## 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.

---

Dit experiment wordt uitgevoerd bij het opzetten van nieuwe influenza muismodellen en ook bij het in gebruik nemen van een nieuwe virusbatch, omdat niet op voorhand valt uit te sluiten dat bij het opnieuw opkweken van het muis-geadapteerde virus andere mutaties optreden dan in de oorspronkelijke batch. In zo'n geval kan het virus zich in de muis anders gaan "gedragen". Het is ook nodig bij implementatie van bestaande influenza muismodellen die overgenomen worden van een ander laboratorium, omdat is gebleken dat experimentele factoren zoals b.v. wijze van

virustoediening, diepte van de narcose, en variatie tussen muizenstammen van invloed kunnen zijn op de uitkomst. Door de uitvoering van o.a. deze experimenten kan worden bepaald of er sprake is van veranderde virulentie van de virusstock, en hoe groot dit effect is.

## 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?

---

## H. Pain and pain relief

---

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

---

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen worden van de toegediende dosis virus, met of zonder profylactische behandeling met neutraliserend antilichaam.

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?

---

- Muizen worden ziek met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte. - Muizen ondervinden daarnaast ongerief van de experimentele handelingen: -In alle groepen: injectie van antilichaam of PBS -In alle groepen: intranasale toediening van influenzavirus onder anesthesie

Explain why these effects may emerge.

---

Ziekte is het gevolg van de influenza infectie. Experimentele handelingen.

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

---

- Voor de intranasale toediening van virus worden de muizen eerst onder narcose gebracht. - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens het bovenstaand scoresysteem (zie onder A). Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

## J. Humane endpoints

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---



Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem (zie onder A), waarin 10.2.g

Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (= HEP). De tijdsduur van de fase waarin muizen een score 4 krijgen is over het algemeen kort.

Indicate the likely incidence.

Naar verwachting zullen de antilichaam-behandelde groepen 0% kans hebben, want deze zijn volledig beschermd. De PBS-behandelde groepen hebben 80%-100% kans.

### **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 ).

Alle dieren in de negatieve, PBS behandelde controle groep ondervinden de nadeligste effecten van de influenza infectie: ernstig, terwijl alle dieren in de positieve, antilichaam-behandelde groep beschermd zijn en gering ongerief zullen ondervinden. Cumulatief ongerief: 50% Ernstig (bij maximale aantal dieren van 600 in looptijd van 5 jaar: 300), 50% licht (bij maximale aantal dieren van 600 in looptijd van 5 jaar: 300).

## **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Overlevende dieren worden geëuthanaseerd ter beëindiging van de proef. Door de blootstelling aan influenza virus is de immuunstatus van deze dieren veranderd en zijn zij voor andere experimenten binnen dit project onbruikbaar geworden.

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

---

# 3e

## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>5</td><td>Aandeel antilichaam component</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	5	Aandeel antilichaam component
Serial number	Type of animal procedure					
5	Aandeel antilichaam component					

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

Om vast te stellen wat het aandeel van de door vaccinatie geïnduceerde antilichamen is in de beschermende werking van de vaccins, wordt het volgende tweedelige experiment uitgevoerd. In het eerste deel worden muizen geïmmuniseerd met kandidaat vaccins van interesse. Vier weken na de laatste vaccinatie worden de dieren verbloed om het serum of plasma te oogsten. Dit serum of serum/plasma uit een andere bron (b.v. bij andere partner/CRO geïmmuniseerde muizen of andere diersoorten, humane sera uit klinische testen op mensen) wordt in het tweede deel intravasculair in nieuwe immunologisch naïeve (muizen die nog nooit aan influenza zijn blootgesteld) muizen gespoten. Deze muizen worden vervolgens met influenzavirus geïnfecteerd. De mate waarin de tweede groep muizen wordt beschermd is het gevolg van de door vaccinatie in de eerste groep muizen opgewekte antilichamen of serum /plasma verkregen uit andere bronnen (b.v. gevaccineerde/geïnfecteerde mensen of andere diersoorten). Deze kennis kan samen met de uitkomsten die in experiment type 6 (Bepaling cellulaire component) worden verkregen bijdragen aan verdere verbetering van het vaccin.

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, overleving en klinische score.

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

---

Layout van deel I:

- ca. 1 week acclimatiseren
- Bloedafname bij alle groepen een dag voor elke vaccinatie voor bepaling van de antilichaamtiter.
- Vaccinatie van testgroepen: 10.2.g

De dieren worden onder narcose gebracht en verbloed. Terminale bloedafname vindt plaats via orbitale sinus, omdat deze methode de grootste opbrengst geeft.

- De dag voor aanvang van de studie, op de dagen van vaccinatie en direct voor het verbloeden worden de dieren gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende scoresysteem gehanteerd: 10.2.g

10.2.g Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen.

In sommige gevallen is alleen uitvoering van het eerste deel nodig, omdat het opgewekte serum gebruikt wordt voor *in vitro* analyses of in een ander Instituut in muizen wordt getest.

Layout van deel II:

- ca. 1 week acclimatiseren
- Tussen 10.2.g Alle serum of plasma behandelgroepen: afname nulbloed m.b.v. 10.2.g voor de eerste behandeling en toediening serum/plasma i.p.; Meestal worden dieren alleen op 10.2.g eenmalig behandeld, in sommige gevallen zijn meerdere doseringen gewenst op meerdere dagen, de dieren worden dan over het algemeen tussen dag 10.2.g en dag 10.2.g eenmaal per dag behandeld.
- Antilichaamtoediening 10.2.g ) positieve controle groep, PBS toediening negatieve controle groep (zie opmerking 1).
- 10.2.g Intranasale inoculatie van influenzavirus (zie opmerking 2), onder narcose.
- 10.2.g De muizen worden dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld, volgens bovenstaand scoresysteem. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. De dieren worden 2x per dag geobserveerd zolang score 3 is gescoord. Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Dieren, die voortijdig worden geëuthanaseerd/ dood gaan, worden ook nog gewogen.
- 10.2.g De muizen worden geëuthanaseerd.
- 

#### Opmerking 1:

De toediening van antilichaam, welke 100% bescherming biedt tegen ziekte en sterfte, is bedoeld als modelcontrole en gouden standaard voor bescherming (en de brug naar voorgaande en toekomstige experimenten). Deze positieve controle groep geeft samen met de negatieve PBS controle groep overzicht over het referentiekader van 0% tot 100% bescherming tegen lethale challenge met influenza virus. Zo wordt het gebruikte modelsysteem gecontroleerd op een correcte werking.

#### Opmerking 2:

De toegediende influenzastam varieert, afhankelijk van het gebruikte vaccin of antivirale middel en het stadium van onderzoek. In eerste instantie wordt het serum/plasma getest in een homologe challenge: de influenzastam is van hetzelfde type als het vaccin. Om te onderzoeken of het serum ook kruisbescherming levert, worden de muizen gechallenged met een heterologe virusstam, die een andere typering heeft dan het vaccinvirus. 10

.2.  
g

---

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

---

Voor deel I en II geldt dat de benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Voor deel I geldt tevens dat de groepsgrootte afhangt van de hoeveelheid serum die nodig is voor uitvoering van het vervollexperiment(en). Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere doelstellingen in 1 experiment bekeken kunnen worden, zodat op controle groepen wordt bespaard. Bijvoorbeeld: experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt gecombineerd met type 5 (aandeel antilichaam component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controle groepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo kan het totale aantal gebruikte dieren binnen het project worden verminderd.

## **B. The animals**

---

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

---

Diersoort: Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF.

In dit project is de vergelijkbaarheid en reproduceerbaarheid van de uitgevoerde experimenten van groot belang. Om dit doel te behalen en om daarnaast het aantal muizen beperkt te houden wordt er naar gestreefd om de variatie zo klein mogelijk te houden. Hiertoe worden leeftijd en gewicht zo veel mogelijk gestandaardiseerd binnen de experimenten. In de wetenschappelijke literatuur worden duidelijke verschillen beschreven in de immuunrespons na influenzavirus infectie en vaccinatie bij vrouwelijke en mannelijke muizen. Hierbij spelen niet alleen hormonale (steroid) verschillen een rol, maar ook genetische verschillen tussen de geslachten (Avitsur, 2010;). Bij een directe vergelijking tussen mannelijke en vrouwelijke muizen in een influenza model blijkt dat het percentage morbiditeit en mortaliteit hoger is bij de vrouwtjes dan bij de mannetjes, mogelijk omdat in de vrouwtjes meer cytokine (TNF, CCL2) wordt geproduceerd (Klein, 2010; Robinson, 2011). Vrouwtjes zijn daardoor het gevoeligste meetsysteem in deze context.

- Avitsur R, Mays JW, Sheridan JF. (2010). Sex differences in the response to influenza virus infection: modulation by stress. *Horm Behav.* 59:257-64..
- Ingersoll MA (2017) Sex differences shape the response to infectious diseases. *PLoS Pathog* 13(12): e1006688
- Sabra L. Klein, Andrea Hodgson, and Dionne P. Robinson (2010). Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 92: 67-73.
- Markle JG, Fish EN. (2010). Sex matters in immunity. *Trends Immunol.* 35:97-104.

- Robinson DP, Lorenzo ME, Jian W, Klein SL. (2011). Elevated 17beta-estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. PLoS Pathog. 7(7):e1002149.

Om de onderlinge variatie tussen de proefdieren zo klein mogelijk te houden en daarmee het aantal benodigde proefdieren te verminderen, wordt gebruik gemaakt van één geslacht. Er is gekozen voor vrouwtjes, omdat die makkelijk in een groep kunnen worden gehuisvest, terwijl mannelijke muizen onderling vaak agressief gedrag vertonen en met elkaar kunnen gaan vechten. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere effectiviteit van de vaccins), verwondingen (die vaak geïnfecteerd raken, hetgeen een nadelig effect heeft op het immuunsysteem, etc) en zelfs sterfte (Laboratory Animals 1999 33:108-121; Anim. Behav. (1973) 21:788-795). Daarnaast blijft dit effect niet beperkt tot de mannetjes zelf, het blijkt dat als dit plaatsvindt binnen de geurdetectie van andere muizen, zowel mannetjes als vrouwtjes, dat stressniveau van deze dieren stijgt, met als gevolg meetbare variatie in de experimentele resultaten (Nature Methods 11(6):629-32)).

(Translationeel) vergelijkingsonderzoek zal op later tijdstip in ontwikkelingstraject worden uitgevoerd in andere diersoort dan muis (mens).

Herkomst: van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf.

**Geschatte aantallen:** aantal dieren per experiment varieert van 50 tot maximaal 300 dieren; per experiment wordt een onderbouwing gegeven van het aantal dieren en ter controle aangeboden bij de IvD. In eerste instantie zullen er voornamelijk experimenten van het type beschreven in bijlage 1 plaatsvinden, na verloop van tijd zal de vraagstelling meer verschuiven van de identificatie van geschikte vaccinkandidaten naar het ophelderen van het werkingsmechanisme van de gekozen kandidaten, hetgeen betekent dat meer proeven plaatsvinden zoals beschreven in bijlagen 5, 6 en 7. Inzichten verkregen aangaande werkingsmechanisme, kan hierna weer leiden naar verbeteringen in vaccins, die getest worden in vaccinatie/challenge experimenten beschreven in bijlage 1. Er wordt er naar gestreeft om zoveel mogelijk experimenten van type 1, 5, 6 en 7 met elkaar te combineren als dit opportuun is, om zodoende o.a. te besparen op het aantal dieren dat wordt gebruikt in de controlegroepen. Om deze reden wil de onderzoeker het aantal dieren voor bijlagen 1, 5, 6 en 7 samenvoegen en als een groep aanvragen. Het aantal proeven in gehele project is 20 tot maximaal 30 proeven per jaar en het maximale aantal dieren per proef is 200 tot maximaal 300, het maximale aantal dieren is 9000 dieren per jaar. Dat is dan voor totale duur van 5 jaar voor deze aanvraag: een maximaal aantal van  $5 \times 9000 = 45.000$  dieren.

Op basis van ervaring is de inschatting dat ca. 15-20% van alle uitgevoerde experimenten uit dit type experiment zal bestaan, dat betekent dat tussen ca. 6750- 9000 dieren in dit type experiment worden benut over de totale looptijd van deze aanvraag. En precieze inschatting maken van de hoeveelheid dieren is erg complex, daar de resultaten van experimenten die nog moeten worden uitgevoerd aan de basis staan van de opvolgende experimenten. Voor elk individueel experiment zal een onderbouwing van het aantal dieren worden gegeven in de experimentaanvraag.

Levensstadia: dieren van ca. 6 weken leeftijd. In sommige gevallen zullen oudere muizen (12+ weken) worden gebruikt om leeftijdseffecten uit te sluiten/te controleren.

### **C. Re-use**

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

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

---

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

---

No

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

---

### **D. Replacement, reduction, refinement**

---

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

---

Vervanging door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een vaccin of virus niet gesimuleerd kan worden. Vermindering: De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere doelstellingen in 1 experiment vastgesteld worden, zodat op controle groepen bespaard kan worden. Bijvoorbeeld experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt gecombineerd met type 5 (aandeel antilichaam component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controle groepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo is het mogelijk om het totale aantal gebruikte dieren binnen het project te verminderen.. Verfijning: De data gegenereerd in de experimenten worden uitvoerig statistisch geanalyseerd. Er worden voortdurend interstudie-analyses en trendanalyses over de verschillende experimentreeksen uitgevoerd ter vergroting van het inzicht in de muismodellen en de werking van de vaccins (voorbeelden daarvan zijn eerder besproken met de DEC). De uitkomsten van deze analyses spelen een belangrijke rol bij het ontwerp van vervolgexperimenten.

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

---



- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren. - Voor toediening van virus worden de muizen onder narcose gebracht. - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A) 10.2.g
- Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in 10.2.g

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

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

De vaccins die worden getest zijn over het algemeen bedacht, gepatenteerd en geproduceerd door de opdrachtgever. Deze vaccins zijn ook niet in het bezit van anderen. Het is vrijwel uitgesloten dat andere partijen dezelfde experimenten hebben uitgevoerd. De onderzoekers die bij dit project betrokken zijn volgen dit in de wetenschappelijke literatuur.

## 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?

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

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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen worden van de toegediende dosis virus, na passieve immunisatie.

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?

- De muizen kunnen ziek worden, met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte. - Verder ondervinden ze ongerief van een aantal experimentele handelingen: Deel I: - **10.2.g** voor elke

vaccinatie: 10.2.g per keer, verbloed op 10.2.g via 10.2.g - Vaccingroepen: 10.2.g  
injectie 10.2.g. Deel II: - Bloedafname voor nulwaarde meting d.m.v. 10.2.g voor toediening van testserum. -  
Serum/plasma behandelgroepen: serum of plasma toediening i.p. - Antilichaam/PBS toediening controlegroepen: 10.2.g - Alle  
groepen: intranasale toediening 10.2.g influenzavirus onder narcose

Explain why these effects may emerge.

De muizen ontwikkelen een pneumonie t.g.v. de influenzavirus infectie. Experimentele handelingen zijn noodzakelijk voor toediening van virus/vaccin/antilichaam en afname van bloedmonsters.

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

- Voor toediening van virus en voor bloedafname worden de muizen onder narcose gebracht. - De muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A). Bij score = 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

#### 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.

Deze omstandigheden worden alleen in deel II verwacht. De muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem (zie onder A), waarbij 10.2.g Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (=HEP). De tijdsduur van de fase waarin muizen een score 4 krijgen is over het algemeen kort.

Indicate the likely incidence.

Deel I: 0% van de dieren. Deel II: De serum of plasma behandelde dieren tonen meer variatie: van 0% tot 100%, afhankelijk van het beschermend vermogen van het overgedragen serum of plasma. Negatieve controlegroep: 80-100% kans. Antilichaam controle groep: 0% kans, het antilichaam geeft volledige bescherming.

#### 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 ).

---

De negatieve controle dieren ondervinden de nadeligste effecten van de influenza infectie: ernstig; antilichaam-behandelde controlegroep: licht. Serum of plasma behandelde dieren tonen meer variatie, maar over het algemeen worden de dieren op zijn minst ten dele beschermd: licht tot matig, maar bij uitblijven van bescherming kan het ongerief oplopen tot ernstig. Geschatte Cumulatief ongerief: - Ernstig: 1.350 (20%), over de gehele looptijd van 5 jaar; - Matig: 4.050 (60%), over de gehele looptijd van 5 jaar; - Licht: 1.350 (20%), over de gehele looptijd van 5 jaar. Bij de inschatting is uitgegaan van maximale inzet van het aantal aangevraagde dieren (30 experimenten per jaar x 300 dieren per experiment x 5 jaar looptijd, waarvan 15% van de dieren (6.750) van de pool in type 5 experimenten worden ingezet). De reële aantallen en het reële ongerief zijn afhankelijk van grootte van het experiment\*, grootte van de diergroepen\*, effectiviteit van de geteste vaccins, etc. (\*= worden bij planning van experimenten bepaald m.b.v. statistische toetsing).

## End of experiment

### L. Method of killing

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

Overlevende dieren worden aan het einde van de proef geëuthanaseerd, omdat door de blootstelling aan influenzavirus de immuunstatus van deze dieren is veranderd en zij voor ander onderzoek onbruikbaar geworden zijn. In sommige gevallen worden dieren aan het eind van de proef gedood om organen (b.v. milt, lymfeknopen, lever, hersenen) en/of bloed te verzamelen voor nader onderzoek.

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

---

# 3f

## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>6</td><td>Aandeel cellulaire component</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	6	Aandeel cellulaire component
Serial number	Type of animal procedure					
6	Aandeel cellulaire component					

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

Om het aandeel van de cellulaire component van het immuunsysteem te bepalen, worden de muizen behandeld met antilichamen, die specifiek delen van het cellulaire immuunsysteem 10.2.g uitschakelen 10.2.g. De dieren worden gevaccineerd en vervolgens geïnfecteerd met influenza virus, zoals beschreven in experiment type 1. In dit experiment worden ze net voor de challenge infectie behandeld met een 10.2.g. Het verschil in bescherming tussen de muizen die wel en niet behandeld zijn met zo'n 10.2.g geeft het aandeel weer van het uitschakelde deel van het immuunsysteem in de beschermende werking van het vaccin. Deze kennis kan bijdragen aan verdere verbetering van het vaccin. Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, overleving en klinische score.

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

---

Layout van typisch cellulair immuniteitsexperiment:

- ca. 1 week acclimatiseren
- 10.2.g Bloedafname 10.2.g voor bepaling van de antilichaamtiter (preserum) van alle groepen.
- 10.2.g Vaccinatie van experimentele groepen (en negatieve controle (PBS) 10.2.g ) aan betreffende groepen.
- 10.2.g Toediening van 10.2.g ) aan betreffende groepen.
- 10.2.g Toediening van 10.2.g ) aan betreffende groepen. Toediening van 10.2.g aan antilichaam controlegroep (zie opmerking 1).
- 10.2.g Bloedafname voor serologisch onderzoek.
- 10.2.g Intranasale inoculatie 10.2.g met een vastgestelde dosis influenzavirus (zie opmerking 2).
- 10.2.g De muizen worden dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende score systeem gehanteerd:

10.2.g

Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Dieren, die voortijdig worden geëthanaseerd/dood gaan, worden ook nog gewogen.

- 10.2.g Einde proef: alle muizen worden geëuthanaseerd.

#### Opmerking 1:

De toediening van antilichaam, welke 100% bescherming biedt tegen ziekte en sterfte, is bedoeld als modelcontrole en gouden standaard voor bescherming (en de brug naar voorgaande experimenten). De PBS (de negatieve controle) en de toediening van antilichaam (de positieve controle) geven samen overzicht over het referentiekader van 0% tot 100% bescherming tegen lethale challenge met influenza virus. Zo wordt het gebruikte modelsysteem gecontroleerd op een correcte werking.

#### Opmerking 2:

De toegediende influenzastam varieert, afhankelijk van het te testen vaccin en het stadium van onderzoek. In eerste instantie wordt het vaccin getest met een homologe challenge: de influenzastam is van hetzelfde type als het vaccin. Om te onderzoeken of het vaccin ook kruisbescherming levert, worden de muizen gechallenged met een heterologe virusstam, die een andere typering heeft dan het vaccivirus. 10.2.g

---

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

---

De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Voorafgaand aan elk experiment wordt eerst een statistische analyse gemaakt om de gewenste groepsgroottes te bepalen. Indien mogelijk worden experimenten zodanig ingericht dat meerdere doelstellingen in 1 experiment bekeken worden, zodat op controle groepen bespaard kan worden. Bijvoorbeeld experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt wanneer mogelijk gecombineerd met experiment typen 5 of 6 (respectievelijk aandeel antilichaam en cellulaire component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controle groepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo kan het totale aantal gebruikte dieren binnen het project worden verminderd.

### **B. The animals**

---

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

---

Diersoort: Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF.

In dit project is de vergelijkbaarheid en reproduceerbaarheid van de uitgevoerde experimenten van groot belang. Om dit doel te behalen en om daarnaast het aantal muizen beperkt te houden wordt er naar gestreefd om de variatie zo klein mogelijk te houden. Hiertoe worden leeftijd en gewicht zo veel mogelijk gestandaardiseerd binnen de experimenten. In de wetenschappelijke literatuur worden duidelijke verschillen beschreven in de immuunrespons na influenzavirus infectie en vaccinatie bij vrouwelijke en mannelijke muizen. Hierbij spelen niet alleen hormonale (steroid)

verschillen een rol, maar ook genetische verschillen tussen de geslachten (Avitsur, 2010;). Bij een directe vergelijking tussen mannelijke en vrouwelijke muizen in een influenza model blijkt dat het percentage morbiditeit en mortaliteit hoger is bij de vrouwtjes dan bij de mannetjes, mogelijk omdat in de vrouwtjes meer cytokine (TNF, CCL2) wordt geproduceerd (Klein, 2010; Robinson, 2011). Vrouwtjes zijn daardoor het gevoeligste meetsysteem in deze context.

- Avitsur R, Mays JW, Sheridan JF. (2010). Sex differences in the response to influenza virus infection: modulation by stress. *Horm Behav.* 59:257-64..
- Ingersoll MA (2017) Sex differences shape the response to infectious diseases. *PLoS Pathog* 13(12): e1006688
- Sabra L. Klein, Andrea Hodgson, and Dionne P. Robinson (2010). Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 92: 67–73.
- Markle JG, Fish EN. (2010). Sex matters in immunity. *Trends Immunol.* 35:97-104.
- Robinson DP, Lorenzo ME, Jian W, Klein SL. (2011). Elevated 17beta-estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. *PLoS Pathog.* 7(7):e1002149.

Om de onderlinge variatie tussen de proefdieren zo klein mogelijk te houden en daarmee het aantal benodigde proefdieren te verminderen, wordt gebruik gemaakt van één geslacht. Er is gekozen voor vrouwtjes, omdat die makkelijk in een groep kunnen worden gehuisvest, terwijl mannelijke muizen onderling vaak agressief gedrag vertonen en met elkaar kunnen gaan vechten. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere effectiviteit van de vaccins), verwondingen (die vaak geïnfecteerd raken, hetgeen een nadelig effect heeft op het immuunsysteem, etc) en zelfs sterfte (*Laboratory Animals* 1999 33:108-121; *Anim. Behav.* (1973) 21:788-795). Daarnaast blijft dit effect niet beperkt tot de mannetjes zelf, het blijkt dat als dit plaatsvindt binnen de geurdetectie van andere muizen, zowel mannetjes als vrouwtjes, dat stressniveau van deze dieren stijgt, met als gevolg meetbare variatie in de experimentele resultaten (*Nature Methods* 11(6):629-32)).

(Translationeel) vergelijkingsonderzoek zal op later tijdstip in ontwikkelingstraject worden uitgevoerd in andere diersoort dan muis (mens).

**Herkomst:** van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf.

**Geschatte aantallen:** aantal dieren per experiment varieert van 50 tot maximaal 300 dieren; per experiment wordt een onderbouwing gegeven van het aantal dieren en ter controle aangeboden bij de IvD. In eerste instantie zullen er voornamelijk experimenten van het type beschreven in bijlage 1 plaatsvinden, na verloop van tijd zal de vraagstelling meer verschuiven van de identificatie van geschikte vaccinkandidaten naar het ophelderen van het werkingsmechanisme van de gekozen kandidaten, hetgeen betekent dat meer proeven plaatsvinden zoals beschreven in bijlagen 5, 6 en 7. Inzichten verkregen aangaande werkingsmechanisme, kan hierna weer leiden naar verbeteringen in vaccins, die getest worden in vaccinatie/challenge experimenten beschreven in bijlage 1. Er wordt er naar gestreeft om zoveel mogelijk experimenten van type 1, 5, 6 en 7 met



elkaar te combineren als dit opportuun is, om zodoende o.a. te besparen op het aantal dieren dat wordt gebruikt in de controlegroepen. Om deze reden wil de onderzoeker het aantal dieren voor bijlagen 1, 5, 6 en 7 samenvoegen en als een groep aanvragen. Het aantal proeven in gehele project is 20 tot maximaal 30 proeven per jaar en het maximale aantal dieren per proef is 200 tot maximaal 300, het maximale aantal dieren is 9000 dieren per jaar. Dat is dan voor totale duur van 5 jaar voor deze aanvraag: een maximaal aantal van  $5 \times 9000 = 45.000$  dieren.

Op basis van ervaring is de inschatting dat ca. 10-15% van alle uitgevoerde experimenten uit dit type experiment zal bestaan, dat betekent dat tussen ca.4500 - 6750 dieren in dit type experiment worden benut over de totale looptijd van deze aanvraag. En precieze inschatting maken van de hoeveelheid dieren is erg complex, daar de resultaten van experimenten die nog moeten worden uitgevoerd aan de basis staan van de opvolgende experimenten. Voor elk individueel experiment zal een onderbouwing van het aantal dieren worden gegeven in de experimentaanvraag.

Levensstadia: muizen van ca. 6-7 weken oud. In sommige gevallen zullen oudere muizen (12+ weken) worden gebruikt om leeftijdseffecten uit te sluiten/te controleren.

### C. Re-use

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

---

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

---

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

---

No

---

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

---

### D. Replacement, reduction, refinement

---

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

---

Vervanging door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een vaccin of virus niet gesimuleerd kan worden. Vermindering: De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de verwachte bescherming van het

vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere vragen in 1 experiment kunnen worden beantwoord, zodat op controlegroepen bespaard kan worden. Bijvoorbeeld: experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt gecombineerd met type 6 (aandeel cellulaire component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controlegroepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo is het mogelijk om het totale aantal gebruikte dieren binnen het project te verminderen. Verfijning: De data gegenereerd in de experimenten worden uitvoerig statistisch geanalyseerd. Er worden voortdurend interstudie-analyses en trendanalyses over de verschillende experimentreeksen uitgevoerd ter vergroting van het inzicht in de muismodellen (voorbeelden daarvan zijn eerder besproken met de DEC). De uitkomsten van deze analyses spelen een belangrijke rol bij het ontwerp van vervolgexperimenten.

---

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

---

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren. - De muizen worden onder narcose gebracht voor toediening van virus en voor bloedafname. - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), waarbij 10.2.g score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd. - Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in 10.2.g

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

De vaccins die worden getest zijn over het algemeen bedacht, geproduceerd en gepatenteerd door de opdrachtgever/onderzoekspartner. Deze vaccins zijn ook niet in het bezit van anderen. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat andere partijen precies dezelfde experimenten hebben uitgevoerd. Het komt wel voor dat een bestaand vaccin wordt meegenomen in het experiment ter vergelijking met de nieuwe kandidaatvaccins. Daarnaast volgen de onderzoekers die bij dit project betrokken zijn de wetenschappelijke literatuur.

## 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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek gevaccineerde en ongevaccineerde muizen **10.2.g** worden na virus challenge.

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?

De muizen kunnen ziek worden, met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte.

Verder ondervinden ze ongerief van een aantal experimentele handelingen: -Bloedafnames, d.m.v. 10.2.g

Experimentele vaccinatie groepen (inclusief negatieve (PBS) controle): 10.2.g - Toediening van 10.2.g

- Antilichaam 10.2.g behandeling controlegroepen: 10.2.g

Alle groepen: intranasale infectie met influenza virus onder narcose

Explain why these effects may emerge.

De muizen ontwikkelen een pneumonie t.g.v. de influenza virus infectie. Experimentele handelingen zijn noodzakelijk voor toediening van virus/vaccin/antilichaam en afname van bloedmonsters.

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

- De dieren worden onder narcose gebracht voor intranasale toediening van het virus. - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A). Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), waarbij 10.2.g

Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (=HEP). De tijdsduur van de fase waarin muizen een score 4 krijgen is over het algemeen kort.

---

Indicate the likely incidence.

---

Dieren in de negatieve controle groep overleven de influenza infectie niet. Het klinische scoringsysteem met daarin het gedefinieerde humane eindpunt moet bijdragen aan het verkorten van het lijden van de dieren. Dieren in een vroeger stadium euthanaseren zal de resolutie van de experimenten enorm doen afnemen. Het komt namelijk veelvuldig voor dat dieren met een klinische score 3 weer herstellen en score 1 of 0 halen.

10.2.g

---

### **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 ).

---

De ongevaccineerde controle dieren ondervinden de nadeligste effecten van de influenza infectie: ernstig; Gevaccineerde dieren tonen meer variatie, maar over het algemeen worden de dieren op zijn minst deels beschermd: licht tot matig, maar bij uitblijven van bescherming door vaccinatie kan het ernstig zijn; antilichaam-behandelde controlegroep: licht. Geschatte Cumulatief ongerief: - Ernstig: 900 (20%), over de gehele looptijd van 5 jaar; - Matig: 2.700 (60%), over de gehele looptijd van 5 jaar; - Licht: 900 (20%), over de gehele looptijd van 5 jaar. Bij de inschatting is uitgegaan van maximale inzet van het aantal aangevraagde dieren (30 experimenten per jaar x 300 dieren per experiment x 5 jaar looptijd, waarvan 10% van de dieren (4.500) van de pool in type 1 experimenten worden ingezet). De reële aantallen en het reële ongerief zijn afhankelijk van grootte van het experiment\*, grootte van de diergroepen\*, effectiviteit van de geteste vaccins, etc. (\*= worden bij planning van experimenten bepaald m.b.v. statistische toetsing).

## **End of experiment**

---

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

Deel van de dieren zal waarschijnlijk sterven aan de gevolgen van de influenza infectie. Overlevende dieren worden aan het einde van de proef geëuthanaseerd, omdat door de blootstelling aan influenza virus de immunestatus van deze dieren is veranderd en zij voor ander onderzoek binnen het project onbruikbaar geworden zijn. In sommige gevallen worden de dieren aan het eind van de proef gedood, waarna organen (b.v. milt, lymfeknopen, lever, hersenen) en/of bloed van de muizen worden verzameld voor nader onderzoek.

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

---

# 3g

## Appendix Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 7	Type of animal procedure Invloed bestaande immuniteit

## 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.

---

In dit experiment wordt onderzocht wat de invloed is van bestaande immuniteit op de effectiviteit van het kandidaatvaccin. Daarvoor worden de muizen eerst "gepre-immuniseerd" en vervolgens gevaccineerd en gechallenged zoals beschreven in experiment type 1 (vaccinatie-challenge experiment). De respons van muizen met pre-immuniteit wordt vergeleken met die van muizen zonder pre-immuniteit.

Primaire uitkomstparameters: Lichaamsgewicht, overleving en klinische score.

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

---

Layout van typisch bestaande immuniteit experiment

- ca. 1 week acclimatiseren
- Bloedafname van alle groepen een dag voor vaccinatie voor bepaling van de antilichaamtiter (preserum).
- Pre-immunisatie van alle groepen 10.2.g [redacted]. De methode van immunisatie is afhankelijk van het virus waartegen pre-immuniteit moet worden opgewekt.
- Bloedafname van alle groepen voorafgaand aan elke vaccinatie voor bepaling van de antilichaamtiter.
- 10.2.g [redacted] na de laatste pre-immunisatie: vaccinatie van testgroepen met kandidaatvaccins 10.2.g [redacted].
- 10.2.g Bloedafname van alle groepen voor bepaling van de antilichaamtiter  
Toediening antilichaam i.v. aan positieve controlegroep en PBS aan negatieve controlegroep (zie opmerking 1).
- 10.2.g Intranasale toediening van influenzavirus.
- 10.2.g [redacted] De muizen worden dagelijks gewogen en klinisch beoordeeld. Voor de klinische beoordeling wordt het volgende score systeem gehanteerd:
  - 10.2.g [redacted]
- 10.2.g [redacted] Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen.
- 10.2.g Einde proef: alle overlevende muizen worden geëuthanaseerd.



### Opmerking 1:

De toediening van antilichaam, welke 100% bescherming biedt tegen ziekte en sterfte, is bedoeld als modelcontrole en gouden standaard voor bescherming (en de brug naar voorgaande experimenten). De PBS (de negatieve controle) en de toediening van antilichaam (de positieve controle) geven samen overzicht over het referentiekader van 0% tot 100% bescherming tegen lethale challenge met influenza virus. Zo wordt het gebruikte modelsysteem gecontroleerd op een correcte werking.

---

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

---

De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Voorafgaand aan elk experiment wordt eerst een statistische analyse gemaakt om de benodigde groepsgroottes te bepalen. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere doelstellingen in 1 experiment kunnen worden gecombineerd, zodat op controlegroepen wordt bespaard. Bijvoorbeeld: experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt wanneer mogelijk gecombineerd met type 5 of 6 (aandeel antilichaam component)cellulaire. De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controle groepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo kan het totale aantal gebruikte dieren binnen het project worden verminderd.

## B. The animals

---

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

---

Diersoort: Muis (*Mus musculus*), vrouwelijke dieren, SPF.

In dit project is de vergelijkbaarheid en reproduceerbaarheid van de uitgevoerde experimenten van groot belang. Om dit doel te behalen en om daarnaast het aantal muizen beperkt te houden wordt er naar gestreefd om de variatie zo klein mogelijk te houden. Hiertoe worden leeftijd en gewicht zo veel mogelijk gestandaardiseerd binnen de experimenten. In de wetenschappelijke literatuur worden duidelijke verschillen beschreven in de immuunrespons na influenzavirus infectie en vaccinatie bij vrouwelijke en mannelijke muizen. Hierbij spelen niet alleen hormonale (steroid) verschillen een rol, maar ook genetische verschillen tussen de geslachten (Avitsur, 2010;). Bij een directe vergelijking tussen mannelijke en vrouwelijke muizen in een influenza model blijkt dat het percentage morbiditeit en mortaliteit hoger is bij de vrouwtjes dan bij de mannetjes, mogelijk omdat in de vrouwtjes meer cytokine (TNF, CCL2) wordt geproduceerd (Klein, 2010; Robinson, 2011). Vrouwtjes zijn daardoor het gevoeligste meetsysteem in deze context.

- Avitsur R, Mays JW, Sheridan JF. (2010). Sex differences in the response to influenza virus infection: modulation by stress. *Horm Behav.* 59:257-64..
- Ingersoll MA (2017) Sex differences shape the response to infectious diseases. *PLoS Pathog* 13(12): e1006688
- Sabra L. Klein, Andrea Hodgson, and Dionne P. Robinson (2010). Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 92: 67-73.
- Markle JG, Fish EN. (2010). Sex matters in immunity. *Trends Immunol.* 35:97-104.
- Robinson DP, Lorenzo ME, Jian W, Klein SL. (2011). Elevated 17beta-estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. *PLoS Pathog.* 7(7):e1002149.

Om de onderlinge variatie tussen de proefdieren zo klein mogelijk te houden en daarmee het aantal benodigde proefdieren te verminderen, wordt gebruik gemaakt van één geslacht. Er is gekozen voor vrouwtjes, omdat die makkelijk in een groep kunnen worden gehuisvest, terwijl mannelijke muizen onderling vaak agressief gedrag vertonen en met elkaar kunnen gaan vechten. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere effectiviteit van de vaccins), verwondingen (die vaak geïnfecteerd raken, hetgeen een nadelig effect heeft op het immuunsysteem, etc) en zelfs sterfte (*Laboratory Animals* 1999 33:108-121; *Anim. Behav.* (1973) 21:788-795). Daarnaast blijft dit effect niet beperkt tot de mannetjes zelf, het blijkt dat als dit plaatsvindt binnen de geurdetectie van andere muizen, zowel mannetjes als vrouwtjes, dat stressniveau van deze dieren stijgt, met als gevolg meetbare variatie in de experimentele resultaten (*Nature Methods* 11(6):629-32)).

(Translationeel) vergelijkingsonderzoek zal op later tijdstip in ontwikkelingstraject worden uitgevoerd in andere diersoort dan muis (mens).

**Herkomst:** van geregistreerd fok/toeleveringsbedrijf.

**Geschatte aantallen:** aantal dieren per experiment varieert van 50 tot maximaal 300 dieren; per experiment wordt een onderbouwing gegeven van het aantal dieren en ter controle aangeboden bij de IvD. In eerste instantie zullen er voornamelijk experimenten van het type beschreven in bijlage 1 plaatsvinden, na verloop van tijd zal de vraagstelling meer verschuiven van de identificatie van geschikte vaccinkandidaten naar het ophelderen van het werkingsmechanisme van de gekozen kandidaten, hetgeen betekent dat meer proeven plaatsvinden zoals beschreven in bijlagen 5, 6 en 7. Inzichten verkregen aangaande werkingsmechanisme, kan hierna weer leiden naar verbeteringen in vaccins, die getest worden in vaccinatie/challenge experimenten beschreven in bijlage 1. Er wordt er naar gestreeft om zoveel mogelijk experimenten van type 1, 5, 6 en 7 met elkaar te combineren als dit opportuun is, om zodoende o.a. te besparen op het aantal dieren dat wordt gebruikt in de controlegroepen. Om deze reden wil de onderzoeker het aantal dieren voor bijlagen 1, 5, 6 en 7 samenvoegen en als een groep aanvragen. Het aantal proeven in gehele project is 20 tot maximaal 30 proeven per jaar en het maximale aantal dieren per proef is 200 tot maximaal 300, het maximale aantal dieren is 9000 dieren per jaar. Dat is dan voor totale duur van 5 jaar voor deze aanvraag: een maximaal aantal van  $5 \times 9000 = 45.000$  dieren. Op basis van ervaring is de inschatting dat ca. 1-5 % van alle uitgevoerde experimenten uit dit type experiment zal bestaan, dat betekent dat tussen ca. 450 - 2250 dieren in dit type experiment worden benut over de totale looptijd van deze aanvraag. En precieze inschatting maken van de

hoeveelheid dieren is erg complex, daar de resultaten van experimenten die nog moeten worden uitgevoerd aan de basis staan van de opvolgende experimenten. Voor elk individueel experiment zal een onderbouwing van het aantal dieren worden gegeven in de experimentaanvraag.

Levensstadia: muizen van ca. 6 weken leeftijd.

### C. Re-use

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

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

---

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

---

No

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

---

### D. Replacement, reduction, refinement

---

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

---

Vervanging door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen met een al aanwezige immuniteit tegen influenza of delen daarvan op een vaccin en/of virus niet kan worden gesimuleerd. Vermindering: Voordat vaccinkandidaten in dit type experiment getest worden, om te bepalen of bestaande immuniteit een complicatie zal zijn bij de toepassing van dat vaccin, zullen deze vaccins de leidende kandidaten zijn en waarschijnlijk geselecteerd zijn voor humane trials, na een gehele selectieproces binnen het project. Deze experimenten zullen hierdoor naar verwachting laag in frequentie zijn. Hiernaast wordt het aantal benodigde dieren in de experimenten uitvoerig statistisch doorgerekend, om enerzijds het aantal dieren te beperken, maar tegelijkertijd wel meer zekerheid te krijgen dat de gegevens die uit het experiment komen bruikbaar zijn om conclusies uit te trekken (en om zo te voorkomen dat experimenten herhaald moeten worden). Verfijning: Het influenza muismodel is in de wetenschappelijke wereld geaccepteerd als geschikt model voor het testen van vaccin en medicijnen voor toepassing in de mens. Binnen het instituut wordt er al meer dan tien jaar intensief gewerkt met influenza muismodellen, waarvan er een groot aantal binnen het instituut ontwikkeld zijn, voor het doel om anti-influenza methodes te onderzoeken.

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

---

- De muizen krijgen ca. 1 week de tijd om te acclimatiseren. - De muizen worden onder narcose gebracht voor toediening van virus. - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem (zie onder A), waarbij 10.2.g
- Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.
- Er worden geen nadelige milieueffecten verwacht, de dieren worden gehouden in gespecialiseerde 10.2.g

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

De vaccins die worden getest zijn over het algemeen bedacht, gepatenteerd en geproduceerd door de opdrachtgever. Deze vaccins zijn ook niet in het bezit van anderen. Daarmee is het vrijwel uitgesloten dat andere partijen precies dezelfde experimenten hebben uitgevoerd. De onderzoekers die bij dit project betrokken zijn volgen de wetenschappelijke literatuur.

## 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?

---

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

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.

Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek gevaccineerde en ongevaccineerde muizen met en zonder pre-immuniteit worden na virus challenge.

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?

De muizen kunnen ziek worden, met algehele malaise (bol zitten), verminderde eetlust, ademhalingsproblemen en in het ernstigste geval sterfte. Verder ondervinden ze ongerief van een aantal experimentele handelingen: -Bloedafnames, d.m.v. 10.2.g per keer - Pre-

immunisatie: 10.2.g

Experimentele vaccinatie: 10.2.g

of PBS: 10.2.g

Controlegroepen: toediening antilichaam 10.2.g  
- Alle groepen: intranasale toediening 10.2.g influenza virus, onder narcose

Explain why these effects may emerge.

De muizen ontwikkelen een pneumonie t.g.v. de influenzavirus infectie. Experimentele handelingen zijn noodzakelijk voor toediening van virus/vaccin/antilichaam en afname van bloed.

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

- De dieren worden onder narcose gebracht voor intranasale toediening van het virus. - Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een scoresysteem (zie onder A). Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd.

#### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), waarbij 10.2.g

Bij score 3 wordt tweemaal daags gecontroleerd. Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (=HEP). De tijdsduur van de fase waarin muizen een score 4 krijgen is over het algemeen kort.

Indicate the likely incidence.

In de ongevaccineerde controle groep 80-100% en in de gevaccineerde groepen gemiddeld 50%. Er zijn soms vaccins die minder werken dan verwacht, dan reageren de dieren in het ergste geval bijna gelijk aan ongevaccineerde dieren. Er zijn ook vaccins die perfect beschermen, waardoor de dieren helemaal geen ongerief ondervinden van de influenza infectie. De antilichaam behandelde controle dieren: 0% kans, het antilichaam geeft volledige bescherming.

#### 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 ).

---

De ongevaccineerde controle dieren ondervinden de nadeligste effecten van de influenza infectie: ernstig. Antilichaam behandelde controle groep: licht. Gevaccineerde dieren tonen meer variatie, maar over het algemeen worden de dieren op zijn minst deels beschermd: licht tot matig, bij uitblijven van bescherming door vaccinatie kan het oplopen tot ernstig. Geschatte Cumulatief ongerief: - Ernstig: 450 (20%), over de gehele looptijd van 5 jaar; - Matig: 1.350 (60%), over de gehele looptijd van 5 jaar; - Licht: 450 (20%), over de gehele looptijd van 5 jaar. Bij de inschatting is uitgegaan van maximale inzet van het aantal aangevraagde dieren (30 experimenten per jaar x 300 dieren per experiment x 5 jaar looptijd, waarvan 5% (2.250) van de dieren van de pool in type 1 experimenten worden ingezet). De reële aantallen en het reële ongerief zijn afhankelijk van grootte van het experiment\*, grootte van de diergroepen\*, effectiviteit van de geteste vaccins, etc. (\*= worden bij planning van experimenten bepaald m.b.v. statistische toetsing).

## End of experiment

### L. Method of killing

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

Overlevende dieren worden aan het einde van de proef geëuthanaseerd, omdat door de blootstelling aan influenzavirus de immuunstatus van deze dieren is veranderd en zij voor ander onderzoek onbruikbaar zijn geworden. In sommige gevallen worden de dieren aan het eind van de proef gedood, waarna organen (b.v. milt, lymfeknopen, lever, hersenen) en/of bloed van de muizen worden verzameld voor nader onderzoek.

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

---

# 4

Format  
Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Ontwikkeling van influenza vaccines
1.2	Looptijd van het project	1-7-2018 - 1-7-2023
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Influenza, griepvirus

## 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

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



### 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)

Griep wordt veroorzaakt door influenzavirussen. Het influenzavirus is erg besmettelijk, dat betekent dat het gemakkelijk van mens op mens kan worden overgedragen. Mensen met griep kunnen behoorlijk ziek zijn. Ze hebben allerlei klachten, zoals koorts, hoofdpijn, keelpijn, spierpijn en hoesten.

Mensen met verhoogd risico op complicaties ten gevolge van de griep komen in aanmerking voor de grieprik. De World Health Organization (WHO) houdt bij welke influenzavirusstammen in de wereld rondgaan en maakt elk jaar een voorspelling welke virusstammen de grootste kans hebben om in de komende winter voor problemen te zorgen. De vaccinfabrikanten zorgen er dan voor dat deze virussen in de grieprik zitten. Soms werkt het vaccin niet goed, omdat de samenstelling van het vaccin niet goed aansluit bij de rondwarende griepvirussen. In dat jaar kan een flinke epidemie ontstaan.

Vogels en ook varkens hebben hun eigen influenzavirussen, die niet makkelijk overspringen naar de mens. Toch bestaat er een kleine kans dat het wel gebeurt. We hebben dit de afgelopen jaren gezien bij de Mexicaanse griep (varken naar mens) en de vogelgriep (vogel naar mens). Omdat de bevolking geen antistoffen tegen zo'n virus heeft en tegen zo'n vreemd virus ook niet direct een vaccin voorradig is, kan een epidemie uitgroeien tot een zogenaamde pandemie (een grote wereldwijde epidemie), waarbij de impact op de volksgezondheid groot is. In zo'n situatie ontstaat ook grote maatschappelijke onrust en economische schade, omdat mensen met belangrijke functies (leraren, buschauffeurs, artsen, verplegers, politieagenten, etc.) niet meer in staat zijn om op het werk te komen. Doel van het project is om vaccins te ontwikkelen, die bijdragen aan de preventie van griep bij de mens. Het gaat om verbeterde versies van bestaande vaccins en om geheel nieuwe vaccins. Het ideale vaccin zou na eenmalige toediening mensen levenslang moeten beschermen tegen alle influenza varianten (de jaarlijks terugkerende seizoensgriep en nieuwe, nog onbekende influenzavirussen, die pandemieën kunnen veroorzaken): één prik tegen alle influenzavirussen.

Om te onderzoeken of en in welke dosis de ontworpen vaccins (het meest) werkzaam zijn, gebruiken we de muis als model voor de mens. Als muizen worden besmet met een influenzavirus krijgen ze een longontsteking en worden ze ziek, vergelijkbaar met mensen met longontsteking volgend op een influenzavirus infectie. Als het vaccin kan voorkomen dat de muizen ziek worden, heeft dit voorspellende waarde voor de werking van het vaccin bij mensen.

3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Dit project moet leiden tot de ontwikkeling van vaccins, die brede en langdurige bescherming bieden tegen influenzavirus infecties: een grieprik tegen alle influenzavirussen. Zulke vaccins kunnen een gunstige bijdrage leveren aan de volksgezondheid. Elk jaar krijgen wereldwijd 3-5 miljoen mensen een ernstige vorm van griep. Sommige mensen worden zelfs zo ziek dat ze eraan overlijden (wereldwijd naar schatting 250.000 tot 500.000 sterfgevallen per jaar). Dit project kan verder bijdragen aan verdieping van de kennis van de mechanismen achter de werking van griepvaccins en mogelijk ook van vaccins tegen andere virale aandoeningen.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Muis ( <i>Mus musculus</i> ): Over een looptijd van 5 jaar is dat bij maximale benutting van het aantal aangevraagde dieren: 48.196 dieren.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Het vaccin wordt meestal toegediend via een injectie in de pootspier of in druppelvorm via de neus. Voor besmetting met influenzavirus worden de muizen eerst onder narcose gebracht en dan wordt een kleine hoeveelheid vloeistof met virus in de neus gedruppeld. De muizen kunnen na de besmetting ernstig ziek worden. Ze hebben minder eetlust, gaan bol zitten als teken van algehele malaise en vertonen ademhalingsproblemen.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	De ziekteverschijnselen optredend na de influenzavirus infectie zijn grotendeels bepalend voor het ongerief. Deze zijn ernstiger naarmate een hogere dosis van het virus wordt toegediend. In vaccinatiestudies worden de dieren niet ziek als het vaccin goed beschermt en is het ongerief licht tot matig; als het vaccin niet/minder goed werkt, worden de dieren wel ziek en kan het ongerief oplopen tot ernstig. Ingeschatte ongerief bij totale benutting van het aantal aangevraagde dieren (48.196): Licht: 10.996 Matig: 27.570 Ernstig: 9.630
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren worden na afloop geëuthanaseerd. Ze kunnen niet meer in andere proeven worden gebruikt, omdat ze zijn besmet met griepvirussen die ook besmettelijk zijn voor de mens.

## 4 Drie V's

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 4.1 | <b>Vervanging</b> Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.    | Met de huidige stand van de wetenschap is het niet mogelijk om de beschermende werking van vaccins zonder gebruik van proefdieren te bepalen. We zijn nog niet in staat om de reactie van het afweersysteem (immuunsysteem) van een levend wezen op een vaccin of een virus in het laboratorium volledig na te bootsen.  |
| 4.2 | <b>Vermindering</b> Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.   | Voordat influenzavaccins worden getest in dieren, worden ze eerst uitvoerig getest in het lab, alleen de meest veelbelovende vaccins zullen worden getest in dieren. Het aantal benodigde dieren in de experimenten wordt uitvoerig statistisch doorgerekend, om het aantal dieren te kunnen beperken, maar tegelijkertijd wel de zekerheid te hebben dat de gegevens die uit het experiment komen, bruikbaar zijn om conclusies uit te trekken (en om zo te voorkomen dat experimenten herhaald moeten worden). |
| 4.3 | <b>Verfijning</b> Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. | Het influenza muismodel is in de wetenschappelijke wereld geaccepteerd als geschikt diermodel voor het testen van vaccins en medicijnen voor toepassing in de mens in de eerste fase van ontwikkeling. Binnen dit project wordt al meer dan tien jaar intensief gewerkt met influenza muismodellen en deze hebben hun waarde bewezen.  |
| 4.4 | Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.               | De dieren worden onder narcose gebracht als virus moet worden toegediend in de neus. Het gedrag en de gezondheid van de dieren wordt dagelijks beoordeeld. Als de muizen griep-achtige symptomen laten zien wordt het toezicht intensiever. Wanneer de ziekte bij de muizen ernstig wordt, zullen de dieren worden geëuthanaseerd om zo onnodig lijden te voorkomen.   |

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

---

Beoordeling achteraf

---

---



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

10.2.e

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD4010020185285

**Bijlagen**

2

Datum 5 april 2018

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 5 april 2018. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van influenza vaccines". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD4010020185285. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Factuur**

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**

5 april 2018

**Aanvraagnummer:**

AVD4010020185285

**Datum:**  
5 april 2018  
**Aanvraagnummer:**  
AVD4010020185285

### Gegevens aanvrager

#### Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100  
Naam instelling of organisatie: Stichting Wageningen Research  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: 10.2.e  
Straat en huisnummer: Akkermaalbos 12  
Postbus: 59  
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN

#### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 10.2.e  
Functie: Onderzoeker  
Afdeling: 10.2.g  
Telefoonnummer: 10.2.e  
E-mailadres: 10.2.e

#### Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?  Nieuwe aanvraag  
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 mei 2018  
Geplande einddatum: 1 mei 2023  
Titel project: Ontwikkeling van influenza vaccines  
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van influenza vaccines  
Naam DEC: DEC Wageningen UR  
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen  
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

**Datum:**

5 april 2018

**Aanvraagnummer:**

AVD4010020185285

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 2.363,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting


**Ondertekening**

Naam: 10.2.e  
Functie: 10.2.e  
Plaats: Wageningen  
Datum: 5 april 2018





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University and Research Facilitair Bedrijf  
T.a.v. crediteurenadministratie  
Postbus 59  
6700 AB WAGENINGEN  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD4010020185285  
**Bijlagen**  
2

Datum 5 april 2018  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 5 april 2018  
Vervaldatum: 5 mei 2018  
Factuurnummer: 185285  
Ordernummer: WUR1149204

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD4010020185285	€ 2.363,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR geeft aangaande het project "Ontwikkeling van influenza vaccins".

#### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD4010020185285**
2. Titel van het project: Ontwikkeling van influenza vaccins
3. Titel van de NTS: Ontwikkeling van influenza vaccins
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
DEC-WUR  
**10.2.e**  
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 05-04-2018  
Aanvraag compleet: 05-04-2018  
In vergadering besproken: 16-04-2018  
Schriftelijke ronde: 07-06-2018 t/m 07-07-2018  
Termijnonderbreking(en) van 17-04-2018 tot 07-06-2018  
Aanpassing aanvraag: 07-06-2018  
Advies aan CCD: zie datum brief
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager  
N.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager  
Datum vragen: 17-04-2018  
Gestelde vragen en antwoorden:
  - In het voorstel wordt ook gesproken over de ontwikkeling van antivirale middelen. Dit wordt echter nergens nader toegelicht. De DEC mist hier de strategie, aanpak en opzet. Ook is de DEC van mening dat dit los staat van de andere bijlagen. De DEC wil dat de onderzoeker onderzoek naar antivirale middelen uit het project schrapt of als extra bijlage toevoegt  
*Ik heb antivirale middelen behouden in de aanvraag. Het is niet mijn verwachting dat het testen van antivirale middelen op grote schaal gaat*

Wageningen  
University & Research

DATUM  
10 juli 2018

ONDERWERP  
aanvraag projectvergunning  
AVD4010020185285

ONSKENMERK  
AVD4010020185285

POSTADRES  
Postbus 65  
8200 AB Lelystad

BEZOEKADRES

**10.2.g**

INTERNET  
www.wur.nl

KVK NUMMER  
09098104

CONTACTPERSOON

**10.2.e**

TELEFOON

**10.2.e**

E-MAIL  
DEC@wur.nl

plaatsvinden, focus ligt op de ontwikkeling van breed beschermend universeel influenza vaccin. Dit is antivirale werk is van 2006 tot 2010 veel gedaan. Maar gezien het verleden van het project en het feit dat er misschien nog voor registratie doeleinden en/of uit wetenschappelijk oogpunt experimenten aangevraagd kunnen worden om werking van antivirale middelen (b.v. passieve immunisatie met **10.2.g**

**10.2.g** te testen of vergelijkingen tussen beschermingsgraad van vaccins vs antivirale middelen of voor de opheldering van werkingsmechanisme van bepaalde antivirale middelen, zou ik graag de spreekwoordelijke deur voor dit type experiment open willen hebben staan. Opzet van zo'n dergelijk experiment is nagenoeg een type 1 vaccinatie/challenge experiment, met de wijziging dat antivirale middel net voor (tussen dag -4 tot dag -1) of net na (tussen dag 0 tot dag 4) (afhankelijk van de vraagstelling, profylactisch of therapeutisch) blootstelling aan influenza wordt toegediend. Mate van ongerief blijft nagenoeg hetzelfde voor muizen in de proef. Aantal muizen in proef en de verdeling over de behandelingsgroepen wordt statistisch bepaald, op basis van vraagstelling, karakteristieken van middel en model, en eventueel aanwezige resultaten uit voorgaande experimenten. Gaarne verwijst ik naar Achtergrond (sectie 3.1) en Onderzoeksstrategie (sectie 3.4.1).

- De DEC ziet graag een flowchart toegevoerd waarin de samenhang van de bijlagen en de beslismomenten weergegeven wordt.  
*Zal worden toegevoegd als bijlage.*
- De DEC verzoekt de onderzoeker om in de bijlagen onder K niet het % dieren te noemen maar het aantal dieren per ongeriefklasse aan te geven.  
*Het aantal dieren per ongeriefklasse is moeilijk te voorspellen. De werkzaamheid van de vaccinkandidaten speelt hier een grote rol in, en deze werkzaamheid moet worden aangetoond in de aangevraagde experimenten. Als een kandidaat vaccin goed werkt, zal alleen de negatieve controlegroep (maximaal 8-10% van totale aantal dieren) negatieve effecten van influenza besmetting ondervinden. Daarnaast is het type experiment van groot belang. Experimenten worden vormgegeven aan de hand van de resultaten van de voorgaande experimenten en de eventuele vragen die voortkomen uit deze resultaten. Een adaptatie experiment zal b.v. de eerste passages symptoomloos verlopen. Geschatte aantal dieren is nu in bijlagen aangegeven.*
- Het aantal dieren per experiment is bepaald aan de hand van ervaring en poweranalyse. Het totaal aantal dieren is echter bepaald o.b.v. capaciteit en niet o.b.v. onderzoeksvraag. De DEC vraagt zich af of dit een reële inschatting is. De IvD heeft deze vraag ook al gesteld en de onderzoeker heeft diverse redenen gegeven waarom voor deze insteek gekozen is: men hoopt o.b.v. huidige resultaten op een snelle ontwikkeling voor groep 1 virussen. Groep 2 virussen volgt op groep 1 virussen in het project en moet de hele ontwikkeling nog door. Verder komt men bij het huidige werk interessante vragen tegen die leiden tot nieuwe experimenten. Om hierop snel te kunnen anticiperen heeft de onderzoeker een ruime inschatting van het aantal proefdieren gemaakt. *Het is inderdaad niet reëel om zuiver op basis van capaciteit een inschatting van het aantal dieren te maken. Er was aanvankelijk gekozen om aantal dieren ruim te nemen, zodat amenderen niet nodig zou zijn. Aantallen dieren is nu bijgesteld.* Het aantal dieren is hoog ingeschat (maximum), er wordt natuurlijk naar gestreefd om tot statistisch verantwoordde resultaten te komen, met behulp van zo klein mogelijk aantal dieren.
- Er is aan de hand van literatuur onderbouwd waarom men alleen vrouwelijke dieren gebruikt. Men beroept zich erop dat onderzoek in het verleden ook met vrouwelijke dieren uitgevoerd wordt maar het is niet duidelijk hoe men het voorgaande onderzoek betreft bij het huidige onderzoek. Alleen refereren naar dat men in het verleden heeft gewerkt met vrouwelijke dieren is in de ogen van de DEC dan ook niet voldoende onderbouwing. Het is de DEC bekend dat vrouwelijke dieren in het algemeen een sterkere immuunrespons hebben. De DEC vraagt zich af of het onderzoek daarmee wel translationeel is naar mannelijke patiënten. Wordt er in de toekomst een vergelijkingsonderzoek opgezet met mannelijke dieren? Concluderend is de DEC van mening dat de geslachtskeuze beter moet worden onderbouwd.

*In aanvraag staat onderstaande:*

*In dit project is de vergelijkbaarheid en reproduceerbaarheid van de uitgevoerde experimenten van groot belang. Om dit doel te behalen en om daarnaast het aantal muizen beperkt te houden wordt er naar gestreefd om de variatie zo klein mogelijk te houden. Hiertoe worden leeftijd en gewicht zo veel mogelijk gestandaardiseerd binnen de experimenten, er wordt daarnaast alles aan gedaan om zo min mogelijk variatie te introduceren. Hierom is gekozen om alleen vrouwelijke dieren te benutten. De reden hier achter is dat mannelijke muizen een aantal kenmerken hebben die storende variatie introduceren binnen experimenten. Mannelijke muizen vertonen agressief gedrag en vechten met elkaar. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere effectiviteit van de vaccins), verwondingen (die vaak geïnfecteerd raken, hetgeen een nadelig effect heeft op het immuunsysteem, etc) en zelfs sterfte (Laboratory Animals 1999 33:108-121; Anim. Behav. (1973) 21:788-795). Daarnaast blijft dit effect niet beperkt tot de mannetjes zelf, het blijkt dat als dit plaatsvindt binnen de geurdetectie van andere muizen, zowel mannetjes als vrouwtjes, dat stressniveau van deze dieren stijgt, met als gevolg meetbare variatie in de experimentele resultaten (Nature Methods 11(6):629-32)). Als men het nadelige effect van dit gedrag op de testresultaten wil compenseren is het nodig om het aantal dieren te vergroten, er is voor gekozen dit niet te doen en zich te beperken tot vrouwelijk dieren. Vergelijkingsonderzoek zal op later tijdstip in ontwikkelingstraject worden uitgevoerd in andere diersoort dan muis (mens).*

DATUM

10 juli 2018

DWS KENMERK

AVD4010020185285

PAGINA

3 van 7

Naar aanleiding van bovenstaande antwoorden zijn nog aanvullende vragen gesteld op 25-04-2018 waarop de antwoorden als volgt zijn:

- Het testen van antivirale middelen heeft een ander doel dan het ontwikkelen van een vaccin en kan om die reden niet in dezelfde bijlage ondergebracht worden. Verder geef je aan dat er (kleine) verschillen zijn t.o.v. bijlage 1 en die worden nergens besproken. Je geeft geen enkele verduidelijking en betere onderbouwing. Je verwijst naar 3.1. en 3.4.1. maar die zijn onveranderd gebleven. En daarmee is de vraag van de DEC niet beantwoord. De DEC mist hier de strategie, aanpak en opzet. *Onderzoeker schrapt het hele antivirale middelen onderdeel.*
- De DEC ziet graag dat in de bijlagen aangegeven wordt dat er indien nodig vaker dan 2x per dag geobserveerd wordt om goed invulling te kunnen geven aan de HEP's. *In alle bijlagen is de volgende tekst toegevoegd aan sectie A2 "Animal procedures" en waar relevant ook aan sectie J2 "Criteria Humane endpoint": Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg is, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Deze laatste sectie (J2) in iVention laat niet toe de kleur van de tekst te veranderen, om deze reden kan de onderzoeker niet voldoen aan de wens van de DEC aangepaste tekst in een andere kleur dan de standaard kleur af te leveren. Het ongerief voor dieren die ernstige longontsteking krijgen wordt ingeschat als ernstig, maar door intensieve monitoring en toepassing van humane eindpunten zal de duur hiervan zo veel mogelijk beperkt worden.*

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)  
N.v.t.



## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

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

## **C. Beoordeling (inhoud)**

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

### *Belangen en waarden*

4. Het uiteindelijke doel is het verminderen en voorkomen van influenza infecties bij mensen door de ontwikkeling van verbeterde en nieuwe influenzavaccins. Dat wordt onderzocht door de werkingsmechanismen van de toegepaste vaccins (en antivirale middelen) in muismodellen te onderzoeken, door de interactie tussen het influenzavirus en het afweersysteem van gastheer op te helderen. Daarnaast kunnen de influenzamuismodellen die worden gebruikt voor de ontwikkeling van vaccins en de daarmee samenhangende kennis over influenza ook worden gebruikt voor de verbetering en ontwikkeling van antivirale middelen. Beide zijn te definiëren als directe doelen van het project.  
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
  - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit
  - Onderzoeker/CRO: wetenschappelijk en economisch belang
  - Farmaceut: economische belang
  - Mens: 1 vaccin dat langdurig en breed beschermt
  - Maatschappij/wereldbevolking: gezondheidsbelang (voorkomen pandemie) en ook een economisch belang
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn. Er zijn legio onderbouwingen met literatuur en de onderzoeksgroep heeft soortgelijk onderzoek reeds eerder succesvol uitgevoerd.
8. De DEC heeft vastgesteld dat, na verduidelijking en aanpassing, het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling(en) binnen het kader van het project.

### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "licht/matig/ernstig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: toediening vaccin via injectie of via neus, infectie onder anesthesie, ziekteverschijnselen van Influenza, euthanasie
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen.: injectie en euthanasie.

13. De DEC heeft, na verduidelijking door de onderzoeker, vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed in ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken. De DEC heeft gediscussieerd of het meerwaarde heeft om geen HEP in te stellen maar "dood in de proef" als eindpunt te nemen. Een DEC-lid met veel expertise op dit vakgebied geeft aan dat dit bij de eerste experimenten wel gehanteerd werd maar dat uit een vertrouwelijke meta-analyse is gebleken dat wanneer de dieren een score 4 bereiken ze niet meer herstellen. Als verfijning is toen een HEP ingesteld wanneer de dieren een score 4 bereiken. Hieruit is ook gebleken dat het verfijnen naar score 3 een substantieel dataverlies zou geven. De DEC heeft gediscussieerd of 2x daags controle van de dieren voldoende is als blijkt dat het ziekteproces snel verloopt. De DEC adviseert om de IvD hierop toe laten te zien en zo nodig aan te geven dat er vaker geobserveerd moet worden.

### 3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Gezien het doel van het project ziet de DEC geen mogelijkheden voor alternatieven. In het voortraject is gebruik gemaakt van alternatieven.
15. De DEC heeft vastgesteld dat, na beantwoording van vragen van de DEC hierover, dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. De DEC verwijst hiervoor naar de antwoorden die de onderzoeker heeft gegeven op de vragen die de DEC hierover gesteld heeft (onder A.9.). Aanvullende heeft de onderzoeker onderstaande aangegeven: *werk in het kader van overkoepelende project wordt ook uitgevoerd bij o.a. 10.2.g*
- 10.2.g [redacted] 10.2.g [redacted]  
[redacted] Vergunninghouder 40100 heeft de know-how en capaciteit om de nu lopende onderzoeken over te nemen, zodat het project niet een al te grote vertraging oploopt en het al uitgevoerde werk niet voor niets gedaan is. Deze plotseling veranderde situatie zorgt ervoor dat het noodzakelijk is om op korte termijn een vergunning te hebben om deze proeven uit te kunnen voeren/af te maken, het maakt het wel moeilijker voor de onderzoeker om het volume van de uit te voeren dierexperimenten in te schatten. Dit heeft er toe bijgedragen dat er gekozen is om het dieraantal, wel realistisch uitvoerbaar, maar wel aan de hoge kant is ingeschat.
- De DEC kan zich hierin vinden
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Als extra verfijning ziet de DEC enkel beter en frequenter observeren van dieren zodat het HEP zo snel mogelijk kan worden toegepast indien blijkt dat 2x per dag observeren onvoldoende is.
17. Er is geen sprake van wettelijk verplicht onderzoek; de vraag over duplicatie is niet van toepassing.

### *Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager, na beantwoording van vragen van de DEC hierover, in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is.
19. De dieren worden gedood in het kader van het project. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er is geen sprake van herplaatsing.

### NTS

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7. De DEC merkt op dat met name paragraaf 3.1. vrij lang is. De DEC is echter van mening dat dit in dit project gerechtvaardigd is omdat het een verhelderende kijk op het project geeft.

#### **D. Ethische afweging**

1. De centrale morele vraag van het project is: Weegt het testen en het ontwikkelen van vaccins die brede en langdurige bescherming bieden tegen influenzavirusinfecties op tegen het matige tot ernstige ongerief dat 48.196 vrouwelijke muizen ondergaan.
2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit in potentie een zeer groot voordeel kan zijn voor de mens en de maatschappij/wereldbevolking. Deze waarde van gezondheid en economie schat de DEC in als substantieel. De farmaceut heeft een belang van economische waarde. De DEC waardeert dit belang als substantieel. Voor de onderzoekers/CRO speelt een wetenschappelijk en economisch belang. De DEC waardeert deze waarden als reëel. Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Zij ervaren maximaal ernstig ongerief als gevolg van de handelingen binnen het project. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.
3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar de ontwikkeling van influenzavaccins met maximaal ernstig ongerief voor maximaal 48.196 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.  
De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.



## E. Advies

1. Advies aan de CCD:
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarde:
    - Door de DEC aan de uitvoering verbonden volgende voorwaarden:
      - IvD laten toezien of 2x per dag observeren voldoende is om invulling te geven aan de humane eindpunten.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Onderstaande constatering naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:
  - De DEC constateert dat voor het uiteindelijk ontwikkelen van Influenza vaccins in deze fase erg veel muizen nodig zijn, en dat hier sprake is van instrumentalisatie van de proefdieren.
  - Tevens heeft de DEC geconstateerd dat de aantallen dieren welke aangevraagd zijn mede zijn gebaseerd op het sluiten van een dierfaciliteit van een CRO welke vergelijkbaar onderzoek tot nu heeft uitgevoerd. Het is echter goed te vernemen dat gegevens tussen beide vergunninghouders uitgewisseld kunnen worden zodat de eerder verkregen data van 10.2.g gebruikt kunnen worden om het onderzoek bij de WUR voort te zetten.
  - Verder heeft de DEC gediscussieerd over het te gebruiken model en de verschillende virusstammen. Het gaat om 1 basismodel met een pneumonie-infectie van influenzavirus in muizen waarvan varianten van het virus ingezet worden. Voor deze varianten moet het infectiemodel per variant opnieuw geoptimaliseerd worden met bijv. verschillen in de gevoelige muizenstam of aanpassing van het infectieprotocol waardoor de aantallen dieren per variant wisselend zijn. Iedere variant op het basismodel heeft zijn eigen karakteristieke curve. De theorie is dat al die virusstammen een geconserveerd epitooop delen. Het uiteindelijke doel is om te komen tot een universeel vaccin dat langdurige bescherming biedt tegen veel influenzavirusstammen en ook bij een pandemische dreiging bescherming kan bieden op basis van het geconserveerde epitooop. Het muizenmodel is gemakkelijk inzetbaar wanneer het om het testen van meerdere varianten gaat. Indien bescherming na vaccinatie met het geconserveerde epitooop leidt tot bescherming tegen (bijna) alle varianten in het muizenmodel wordt effectiviteit verder onderzocht in een frettenmodel en daarna in een apenmodel (beiden niet in deze aanvraag opgenomen). De muis wordt dus ingezet als eerste selectiestap ('screeningsmodel') voor de verdere ontwikkeling.

DATUM  
10 juli 2018

ONSKENMERK  
AVD4010020185285

PAGINA  
7 van 7

10.2.e

10.2.e

secretaris DEC WUR





**Van:** 10.2.e  
**Aan:** Info-zbo: "vergunningen@wur.nl"  
**Cc:** 10.2.e  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD4010020185285  
**Datum:** maandag 5 november 2018 20:08:38

---

Geachte 10.2.e  
Tot op heden heeft de CCD de aangepaste documenten nog niet mogen ontvangen, zoals in onderstaand mailverkeer is besproken. Zou u de documenten alsnog via de beveiligde server kunnen verzenden? Alvast bedankt.

Met vriendelijk groet,

10.2.e

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** Info-zbo

**Verzonden:** dinsdag 21 augustus 2018 15:51

**Aan:** 'vergunningen@wur.nl'

**CC:** 10.2.e

**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD4010020185285

Geacht 10.2.e,

Dank u voor het toesturen van de antwoorden. Wij hebben inderdaad nog wel de aangepaste documenten nodig. Voor nu heb ik wel de antwoorden doorgezeten naar de CCD. Uw aanvraag zal in de CCD vergadering van 24 augustus worden besproken.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Geachte 10.2.e,

Bijgevoegd treft u in een word-document de antwoorden aan van de onderzoeker op de door u gestelde vragen. I.v.m. de vakantie en technische problemen met het digitale dierproefprogramma is het op dit moment niet mogelijk de antwoorden integraal te verwerken in de projectdocumenten en appendices. Dit zal uiteraard worden gedaan, zodra dat mogelijk is. Ik hoop dat u desondanks op basis van de toelichting tot een ethische beoordeling van het project kunt komen, mede gezien het feit, dat de haperende mailwisseling tussen CCD en onderzoeker al tot vertraging heeft geleid.

Met vriendelijke groet

10.2.e

Vergunningenloket

---

**Van:** Info-zbo

**Verzonden:** woensdag 15 augustus 2018 15:51

**Aan:** vergunningen@wur.nl

**CC:** 10.2.e

**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD4010020185285

Geachte 10.2.e,

Wij hebben nog geen antwoord ontvangen op onderstaande vragen. Zou u deze z.s.m. kunnen aanleveren? We zouden uw aanvraag graag in de eerstvolgende CCD vergadering opnieuw willen inbrengen. Hiervoor hebben wij uiterlijk aanstaande maandag een reactie op onderstaande vraag nodig. Denkt u dat dit gaat lukken?

Met vriendelijke groet,

10.2.e

**Van:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

**Verzonden:** dinsdag 24 juli 2018 13:14

**Aan:** vergunningen@wur.nl

**CC:** 10.2.e

**Onderwerp:** Aanhouden AVD4010020185285

Geachte 10.2.e,

Op 05-04-2018 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven

ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van influenza vaccines" met aanvraagnummer AVD4010020185285. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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**

De onderbouwing van het aantal te gebruiken dieren is te summier. Kunt een u betere onderbouwing geven hoe u aan de aantallen dieren komt?

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.

### **Wanneer een beslissing**

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

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

**10.2.e**

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**"De onderbouwing van het aantal te gebruiken dieren is te summier. Kunt een u betere onderbouwing geven hoe u aan de aantallen dieren komt?"**

In reactie op deze vraag van de CCD volgt hieronder een uitgebreide toelichting, beginnend met een aanvulling op de introductie:

**Groep I en groep II influenza type A virussen en influenza type B virussen zijn verschillend**

De Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) houdt bij welke influenzastammen in de wereld rondgaan en maakt elk jaar een voorspelling welke daarvan de grootste kans hebben om in de komende winter voor problemen te zorgen. Op basis van die gegevens wordt een selectie gemaakt van de virusstammen die dat jaar in het griepvaccin zullen worden opgenomen. De laatste 18 jaar bevat het griepvaccin altijd influenza A stammen uit groep I en groep II en een influenza B virus. Een universeel griepvaccin zal binnen de groep I virussen kruisbescherming geven, binnen de groep II virussen en binnen de groep B virussen. Voor elke groep en type zal wel een apart antigeen moeten worden gebruikt; het is niet mogelijk om met één antigeen groep- of type-overschrijdende bescherming op te wekken.

De onderzoekers hebben in de afgelopen jaren met succes een vaccin ontwikkeld dat tegen alle groep I virussen (H5, H1, H9, e.a.) van type A beschermt. Ze volgen nu dezelfde aanpak om een antigeen/ vaccin te ontwikkelen dat tegen alle groep II virussen (H7, H3, e.a.) van type A beschermt en ook een antigeen/vaccin dat tegen alle type B virussen beschermt. Dit verklaart dat ook nu nog nieuwe vaccinkandidaten in vaccinatie-challenge experimenten moeten worden onderzocht. Uiteindelijk zal een universeel griepvaccin uit 3 virussen (antigenen) bestaan (trivalent, net als nu het geval is bij de jaarlijkse griepvaccin), alleen is eenmalige vaccinatie dan voldoende voor levenslange bescherming tegen de griep en hoeft het griepvaccin niet meer elk jaar te worden aangepast, het maakt niet uit welk virus er rondwaart.

De overwegingen voor het benodigde aantal dieren zijn moeilijk te overzien als ze apart in elke bijlage worden genoemd. Hieronder is e.e.a. op een rij gezet.

- Uitgangspunt is dat tijdens het project in totaal naar schatting 20 proeven per jaar zullen worden uitgevoerd (drie jaar geleden waren het 23 dierproeven, het jaar daarvoor 20); afhankelijk van de uitkomsten (bij tegenvallende resultaten) kan het mogelijk oplopen tot max. 30 proeven per jaar (**20 - max. 30 proeven per jaar**)
- En dat voor deze proeven (combinatie-) naar schatting 200 olopend tot maximaal 300 dieren per proef nodig zijn (**200 - max. 300 dieren per proef**).
- De ervaring leert dat **8-10 dieren per groep** in de meeste gevallen statistisch significante data opleveren ( $\alpha=0.05$ ).
- Bij voorbeeld: bij een proefopzet waarin 2 vaccins worden onderzocht, met 2 verschillende formuleringen, en 2 vaccinatierégimes (1x of 2x vaccineren) en 3 verschillende antigeen doses zullen  $10 \times 2 \times 2 \times 2 \times 3$  muizen + 2 controlegroepen  $\times 10$  muizen = 260 muizen worden gebruikt.
- Dit betekent dat voor max. 30 proeven 6000 – max. 9000 dieren per jaar en **30.000 - max. 45.000 dieren** voor de totale duur van **5 jaar** nodig zullen zijn.

In eerste instantie zullen er voornamelijk vaccinatie-challenge experimenten van het type 1 plaatsvinden. Eerst worden verschillende vaccinkandidaten naast elkaar onderzocht, daaruit worden de beste geselecteerd, vervolgens worden verschillende doses, adjuvantia en vaccinatierégimes met elkaar vergeleken, etc.. Na selectie van effectieve vaccins/bijbehorende dosis/formulering gaat de vraagstelling ook richting het ophelderen van het werkingsmechanisme van die betreffende kandidaten, hetgeen betekent dat meer proeven plaatsvinden zoals beschreven in bijlagen 5 en 6. In dat stadium zal ook de invloed van de bestaande immuniteit op het effect van vaccinatie worden onderzocht zoals beschreven in bijlage 7.

Het streven is om experimenten van type 1, 5, 6 en later 7 zoveel mogelijk met elkaar te combineren, om zodoende o.a. te besparen op het aantal dieren dat wordt gebruikt in de controlegroepen. Dit is de reden dat het geschatte aantal dieren voor bijlagen 1, 5, 6 en 7 is samengevoegd en als een groep wordt

ingeschat. De precieze aantallen vallen op voorhand moeilijk te geven, daar de resultaten van experimenten die nog moeten worden uitgevoerd aan de basis staan van de opzet van opvolgende experimenten. Voor elk individueel experiment zal een onderbouwing van het aantal dieren worden gegeven in de experimentaanvraag.

Onderstaande tabel geeft een schatting van het aantal benodigde proefdieren voor elk type experiment bij verschillende scenario's. Het geschatte aantal dieren is 30.000 tot een maximum van 45.000 over de looptijd van 5 jaar.

Specificatie van het geschatte aantal benodigde proefdieren over 5 jaar				
		30 exp./jaar		20 exp./jaar
		n=200	n=300	n=300
		<b>30000</b>	<b>45000</b>	<b>30000</b>
type 1*	60%	18000	27000	18000
type 5	15%	4500	6750	4500
type 6	15%	4500	6750	4500
type 7	5%	1500	2250	1500
type 2	5-10%	1230	1230	1230
type 3		1350	1350	1350
type 4		600	600	600
≈ aantal dieren per 5 jaar		31680	45930	31680
* deels i.c.m. type 5, 6 en/of 7				

Op basis van ervaring is de inschatting dat ca. **60-70%** van alle uitgevoerde experimenten een type 1 (in combinatie met 5, 6, 7) experiment zal zijn. Bij het onderzoek naar vaccinkandidaten in dat type experimenten zullen naar schatting  $0.6 \times 30.000 - 45.000 =$  **18.000 tot max. 31.500 dieren** worden gebruikt over de totale looptijd van de aanvraag.

Een type 2 experiment, waarin een humaan influenzavirus aan de muis wordt aangepast, zal max. 20 passages nodig hebben. Met 3 muizen per passage en 2 passagelijnen (2 verschillende doses) zijn  $20 \times 3 \times 2$  plus  $1 \times 3$  muizen voor de tussentijdse virulentiebepaling van het gepasseerde virus = 123 dieren nodig. Het aantal humane griepvirussen dat aan de muis moet worden aangepast wordt gesteld op 10. Dan zijn voor het genereren van muis-geadapteerde virusvarianten in totaal **1230 muizen** nodig.

De challenge dosis van de muis-geadapteerde virussen wordt bepaald in experiment type 3. Dit type experiment wordt ook uitgevoerd na de reproductie van bestaande muis-geadapteerde virusstocks.

- Eerste deel, max. aantal dieren per experiment: 30
- Tweede deel, max. aantal dieren per experiment: 60
- Geschatte maximale aantal experimenten per jaar: 3
- geschatte maximale aantal dieren/jaar:  $(3 \times 30) + (3 \times 60) = 270$
- Voor gehele looptijd van 5 jaar: **1350 dieren**

Type 4: geschat maximaal 3 studies per jaar met maximaal 40 dieren per experiment, Geschatte maximale aantal dieren: 120 dieren/jaar; over de gehele looptijd van 5 jaar: **600 dieren**.

Op dit moment kan ik niet meer detaillering geven van de aantallen dieren die benut zullen worden. De precieze aantallen dieren worden per experiment bepaald op basis van de vraagstelling op dat moment, gecombineerd met de verkregen resultaten uit voorgaande experimenten (statistisch uitgewerkt) en ervaringen van afgelopen jaren vastgesteld door multidisciplinair team van wetenschappers (virologen, immunologen, dierenarts, biotechnici en statistici) van de zijde van de opdrachtgever en de CRO. Het

aantal te benutten dieren wordt vastgelegd in een studieplan met onderliggend statistisch rapport voor elk desbetreffend dierexperiment.

Bij de statistische analyse worden overleving en lichaamsgewicht beschouwd als primaire parameters, de klinische score is een secundaire parameter.

- Overlevingstijd na de challenge wordt geanalyseerd m.b.v. de log-rank test en het overlevingsaantal (%) met de Fisher's exact test.
- Verandering in lichaamsgewicht (in vergelijking met het gewicht op dag 0) wordt uitgedrukt als *Area Under the Curve* (AUC). The AUC's worden met elkaar vergeleken in een *one-way analysis of variance* (ANOVA). Vergelijkingen van de experimentele groepen met de controle groep worden uitgevoerd met een post-hoc test volgens Dunnett (voor meervoudige vergelijkingen).
- De klinische scores worden geanalyseerd volgens de GENMOD procedure (m.b.v. SAS).

Ik vertrouw erop dat u op basis van deze informatie in staat bent om mijn aanvraag goed te kunnen beoordelen. Als het bij u nieuwe vragen oproept, dan ben ik graag bereid om nadere toelichting te geven.

In afwachting van uw antwoord, vriendelijk groetend,

10.2.e



## Advies aan CCD

Datum 24 juli 2018  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20185285

Instelling: Stichting Wageningen Research  
Onderzoeker: 10.2.e  
Project: Ontwikkeling van influenza vaccines  
Aanvraagnummer: AVD20185285  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
Translationeel of toegepast onderzoek

### 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<b>Proces</b>	Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC. Aan de aanvrager is gevraagd om een betere onderbouwing van het aantal te gebruiken dieren te geven.  Het antwoord hierop is nog niet ontvangen.
---------------	--

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.4.1 Vaccinatie/challenge experiment</b>				
	Muizen (Mus musculus)		31.500	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.4.2 Virusadaptatie in muis</b>				
	Muizen (Mus musculus)		1.246	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.4.3 Bepaling van infectiedosis</b>				
	Muizen (Mus musculus)		1.350	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.4.4 Bepaling van dynamische bereik influenzamodel</b>				
	Muizen (Mus musculus)		600	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.4.5 Aandeel antilichaam component</b>				
	Muizen (Mus musculus)		6.750	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.4.6 Aandeel cellulaire component</b>				
	Muizen (Mus musculus)		4.500	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
<b>3.4.4.7 Invloed bestaande immuniteit</b>				
	Muizen (Mus musculus)		2.250	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Citaten gebruik pijnbestrijding: Er worden geen pijnstillers toegepast, omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden t.a.v. gedrag (sedatief) en/of klinisch-pathologische verschijnselen (ontstekingsremmend). De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de gevaccineerde muizen worden na virus challenge.

Bijlage 2: De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen worden na toediening van het virus.

Bijlage 3: De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen worden van de toegediende dosis virus.

Bijlage 4: De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen worden van de toegediende dosis virus, met of zonder profylactische behandeling met neutraliserend antilichaam.

Bijlage 5: De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek de muizen



worden van de toegediende dosis virus, na passieve immunisatie.

Bijlage 6: De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek gevaccineerde en ongevaccineerde muizen **10.2.g** worden na virus challenge.

Bijlage 7: De onderzoekers willen weten of, wanneer en hoe ziek gevaccineerde en ongevaccineerde muizen met en zonder pre-immuniteit worden na virus challenge.

### **Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren**

- 3.4.4.1 Vaccinatie/challenge experiment / Muizen (*Mus musculus*): Citaat: In dit project is de vergelijkbaarheid en reproduceerbaarheid van de uitgevoerde experimenten van groot belang. Om dit doel te behalen en om daarnaast het aantal muizen beperkt te houden wordt er naar gestreefd om de variatie zo klein mogelijk te houden. Hiertoe worden leeftijd en gewicht zo veel mogelijk gestandaardiseerd binnen de experimenten. In de wetenschappelijke literatuur worden duidelijke verschillen beschreven in de immunrespons na influenzavirus infectie en vaccinatie bij vrouwelijke en mannelijke muizen. Hierbij spelen niet alleen hormonale (steroid) verschillen een rol, maar ook genetische verschillen tussen de geslachten (Avitsur, 2010;). Bij een directe vergelijking tussen mannelijke en vrouwelijke muizen in een influenza model blijkt dat het percentage morbiditeit en mortaliteit hoger is bij de vrouwtjes dan bij de mannetjes, mogelijk omdat in de vrouwtjes meer cytokine (TNF, CCL2) wordt geproduceerd (Klein, 2010; Robinson, 2011). Vrouwtjes zijn daardoor het gevoeligste meetsysteem in deze context.

Om de onderlinge variatie tussen de proefdieren zo klein mogelijk te houden en daarmee het aantal benodigde proefdieren te verminderen, wordt gebruik gemaakt van één geslacht. Er is gekozen voor vrouwtjes, omdat die makkelijk in een groep kunnen worden gehuisvest, terwijl mannelijke muizen onderling vaak agressief gedrag vertonen en met elkaar kunnen gaan vechten. Dit leidt o.a. tot stress (hetgeen leidt tot verhoogde cortisol niveaus die een nadelig effect hebben op het immuunsysteem, wat weer leidt tot lagere effectiviteit van de vaccins), verwondingen (die vaak geïnfecteerd raken, hetgeen een nadelig effect heeft op het immuunsysteem, etc) en zelfs sterfte (Laboratory Animals 1999 33:108-121; Anim. Behav. (1973) 21:788-795). Daarnaast blijft dit effect niet beperkt tot de mannetjes zelf, het blijkt dat als dit plaatsvindt binnen de geurdetectie van andere muizen, zowel mannetjes als vrouwtjes, dat stressniveau van deze dieren stijgt, met als gevolg meetbare variatie in de experimentele resultaten (Nature Methods 11(6):629-32)). (Translationeel) vergelijkingsonderzoek zal op later tijdstip in ontwikkelingstraject worden uitgevoerd in andere diersoort dan muis (mens).

- 3.4.4.2 Virusadaptatie in muis / Muizen (*Mus musculus*): Zie bijlage 3.4.4.1
- 3.4.4.3 Bepaling van infectiedosis / Muizen (*Mus musculus*): Zie bijlage 3.4.4.1
- 3.4.4.4 Bepaling van dynamische bereik influenzamodel / Muizen (*Mus musculus*): Zie bijlage 3.4.4.1
- 3.4.4.5 Aandeel antilichaam component / Muizen (*Mus musculus*): Zie bijlage 3.4.4.1
- 3.4.4.6 Aandeel cellulaire component / Muizen (*Mus musculus*): Zie bijlage 3.4.4.1
- 3.4.4.7 Invloed bestaande immuniteit / Muizen (*Mus musculus*): Zie bijlage 3.4.4.1

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p><b>11.1</b></p> <p>Citaat C13: De DEC heeft, na verduidelijking door de onderzoeker, vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.</p> <p>De DEC heeft gediscussieerd of het meerwaarde heeft om geen HEP in te stellen maar "dood in de proef" als eindpunt te nemen. Een DEC-lid met veel expertise op dit vakgebied geeft aan dat dit bij de eerste experimenten wel gehanteerd werd maar dat uit een vertrouwelijke meta-analyse is gebleken dat wanneer de dieren een score 4 bereiken ze niet meer herstellen. Als verfijning is toen een HEP ingesteld wanneer de dieren een score 4 bereiken. Hieruit is ook gebleken dat het verfijnen naar score 3 een substantieel dataverlies zou geven. De DEC heeft gediscussieerd of 2x daags controle van de dieren voldoende is als blijkt dat het ziekteproces snel verloopt. De DEC adviseert om de IvD hierop toe laten te zien en zo nodig aan te geven dat er vaker geobserveerd moet worden.</p> <p>Citaat C15: De DEC heeft vastgesteld dat, na beantwoording van vragen van de DEC hierover, dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. De DEC verwijst hiervoor naar de antwoorden die de onderzoeker heeft gegeven op de vragen die de DEC hierover gesteld heeft (onder A.9). Aanvullende heeft de onderzoeker onderstaan de aangegeven: werk in het kader van overkoepelende project wordt ook uitgevoerd bij <b>10.2.g</b></p>
-------------------	---

**10.2.g** Vergunninghouder 40100 heeft de know - how en capaciteit om de nu lopende onderzoeken over te nemen, zodat het project niet een al te grote vertraging oploopt en het al uitgevoerde werk niet voor niets gedaan is. Deze plotseling veranderde situatie zorgt ervoor dat het noodzakelijk is om op korte termijn een vergunning te hebben om deze proeven uit te kunnen voeren/af te maken, het maakt het wel moeilijker voor de onderzoeker om het volume van de uit te voeren dierexperimenten in te schatten. Dit heeft er toe bijgedragen dat er gekozen is om het dieraantal, wel realistisch uitvoerbaar, maar wel aan de hoge kant is ingeschat. De DEC kan zich hierin vinden

Citaat C18: De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager, na beantwoording van vragen van de DEC hierover, in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat:

De centrale morele vraag van het project is: Weegt het testen en het ontwikkelen van vaccins die brede en langdurige bescherming bieden tegen influenzavirusinfecties op tegen het matige tot ernstige ongerief dat 48.196 vrouwelijke muizen ondergaan?

De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit in potentie een zeer groot voordeel kan zijn voor de mens en de maatschappij/ wereldbevolking. Deze waarde van gezondheid en economie schat de DEC in als substantieel. De farmaceut heeft een belang van economische waarde. De DEC waardeert dit belang als substantieel. Voor de onderzoekers/ CRO speelt een wetenschappelijk en economisch belang. De DEC waardeert deze waarden als reëel.

Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Zij ervaren maximaal ernstig ongerief als gevolg van de handelingen binnen het project. De integriteit van de proefdieren in dit project wordt niet sterk er aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef .

Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar de ontwikkeling van in fluenzavaccins met maximaal ernstig ongerief voor maximaal 48.196 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de

aanvraag.

De centrale morele vraag kan met " ja " beantwoord worden.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij  
- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Er zijn vragen gesteld over ontwikkeling van antivirale middelen, toevoeging van een flowchart, het indelen in % van het ongerief, de ruime inschatting wat betreft het aantal te gebruiken proefdieren en een betere onderbouwing wat betreft het enkel gebruik van vrouwelijke dieren

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden

IvD laten toezien of 2x per dag observeren voldoende is om invulling te geven aan de humane eindpunten.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat:

- De DEC constateert dat voor het uiteindelijk ontwikkelen van Influenza vaccins in deze fase erg veel muizen nodig zijn, en dat hier sprake is van instrumentalisatie van de proefdieren.

o Tevens heeft de DEC geconstateerd dat de aantallen dieren welke aangevraagd zijn mede zijn gebaseerd op het sluit en van een dierfaciliteit van een CRO welke vergelijkbaar onderzoek tot nu heeft uitgevoerd.

Het is echter goed te vernemen dat gegevens tussen beide vergunninghouders uitgewisseld kunnen worden zodat de eerder verkregen data van 10.2.g gebruikt kunnen worden om het onderzoek bij de WUR voort te zetten.

- Verder heeft de DEC gediscussieerd over het te gebruiken model en de verschillende virusstammen. Het gaat om 1 basismodel met een pneumonie infectie van influenzavirus in muizen waarvan varianten van het virus ingezet worden. Voor deze varianten moet het infectiemodel per variant opnieuw geoptimaliseerd worden met bijv. verschillen in de gevoelige muizenstam of aanpassing van het infectieprotocol waardoor de aantallen dieren per variant wisselend zijn. Iedere variant op het basismodel heeft zijn eigen karakteristieke curve. De theorie is dat al die virusstammen een geconserveerd epitoom delen. Het uiteindelijke doel is om te komen tot een universeel vaccin dat langdurige bescherming biedt tegen veel influenzavirusstammen en ook bij een pandemische dreiging



bescherming kan bieden op basis van het geconserveerde epitooop. Het muizenmodel is gemakkelijk inzetbaar wanneer het om het testen van meerdere varianten gaat. Indien bescherming na vaccinatie met het geconserveerde epitooop leidt tot bescherming tegen (bijna) alle varianten in het muizenmodel wordt effectiviteit verder onderzocht in een frettenmodel en daarna in een apenmodel (beiden niet in deze aanvraag opgenomen). De muis wordt dus ingezet als eerste selectiestap ('screeningsmodel') voor de verdere ontwikkeling.

### 3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
11.1	<p>[Redacted content]</p>

### 4 Inhoudelijke beoordeling

<p><b>Doelstelling</b> Doelstelling</p>	<p>Citaat: Het hoofddoel van het project is het verminderen en bij voorkeur voorkomen van ziekte ten gevolge van influenza infecties bij mensen door de ontwikkeling van verbeterde en nieuwe influenzavaccins en antivirale middelen. Daarbij wordt de werkzaamheid van voornamelijk vaccinkandidaten onderzocht door gebruik te maken van verschillende influenza muismodellen. Nevendoelen zijn: Inzicht verkrijgen in de werkingsmechanismen van de toegepaste vaccins. En ook de interactie tussen het influenza virus en het afweersysteem van gastheer pogen op te helderen.</p>
---	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Citaat: Het uiteindelijke doel van het project is het verminderen en bij voorkeur voorkomen van ziekte veroorzaakt door influenza infecties bij mensen door de ontwikkeling van verbeterde en nieuwe influenzavaccins en antivirale middelen. Stap voor stap worden in dit programma vaccins verbeterd. De heilige graal is een universeel influenzavaccin. De wetenschappelijk relevantie is dat, gedurende dit proces van vaccinverbetering, de fundamentele kennis over de werking van vaccins, het immuunsysteem en influenza virussen vergroot wordt. Deze kennis zal ook in de preventie en bestrijding van andere infectieziekten, zoals b.v. hRSV, gebruikt worden. De maatschappelijke relevantie is te vinden in de verbeterde volksgezondheid en de vermindering van de daaraan gekoppelde economische schade, wanneer de kennis die opgedaan wordt binnen dit project, wordt toegepast in de vorm van verbeterde en vernieuwde vaccins en antivirale middelen.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1 
<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	Citaat C7: De DEC heeft vast gesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn. Er zijn legio onderbouwingen met literatuur en de onderzoeksgroep heeft soortgelijk onderzoek reeds eerder succesvol uitgevoerd.  11.1 

### 3V's

Vervanging	
	<b>3.4.4.1 Vaccinatie/challenge experiment:</b> Citaat: Door in vitro methoden is met de huidige stand van de wetenschap niet mogelijk, omdat de reactie van een levend wezen en in het bijzonder van het afweersysteem (immuunsysteem) op een vaccin, antiviraal middel of virus niet gesimuleerd kan worden.
	<b>3.4.4.2 Virusadaptatie in muis:</b> Zie bijlage 3.4.4.1
	<b>3.4.4.3 Bepaling van infectiedosis:</b> Zie bijlage 3.4.4.1
	<b>3.4.4.4 Bepaling van dynamische bereik influenzamodel:</b> Zie bijlage 3.4.4.1
	<b>3.4.4.5 Aandeel antilichaam component:</b> Zie bijlage 3.4.4.1
	<b>3.4.4.6 Aandeel cellulaire component:</b> Zie bijlage 3.4.4.1
	<b>3.4.4.7 Invloed bestaande immuniteit:</b> Zie bijlage 3.4.4.1
Verminderen	

	<p><b>3.4.4.1 Vaccinatie/challenge experiment:</b> Citaat: Voordat influenzavaccins worden getest in dieren, worden ze eerst uitvoerig getest in het lab; alleen de meest veelbelovende vaccinkandidaten zullen worden getest in dieren. Hierna wordt het aantal benodigde dieren in de experimenten uitvoerig statistisch doorgerekend, om het aantal dieren te beperken, maar tegelijkertijd wel zekerheid te krijgen dat de gegevens die uit het experiment komen bruikbaar zijn om conclusies uit te trekken (en om zo te voorkomen dat experimenten herhaald moeten worden). De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Voor een experiment wordt gedaan wordt eerst een statistische analyse gemaakt om de groepsgroottes te bepalen. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere vragen in 1 experiment kunnen worden beantwoord, zodat op controlegroepen bespaard kan worden. Bijvoorbeeld: experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt gecombineerd met type experiment 5 of 6 (aandeel antilichaam component of aandeel cellulaire component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controlegroepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo is het mogelijk om het totaal aantal gebruikte dieren binnen het project te verminderen.</p>
	<p><b>3.4.4.2 Virusadaptatie in muis:</b> Citaat: Het experiment wordt uitgevoerd met een klein aantal dieren, maar de ervaring leert dat het voldoende is om een succesvolle adaptatie te kunnen uitvoeren en telkens voldoende longmateriaal te kunnen oogsten voor de volgende passage. Bij elke passage neemt de kans op mutaties in het genoom van het influenza virus toe. Om zo dicht mogelijk bij het originele virus te blijven, wordt het aantal passages in muizen, en daarmee ook het aantal benodigde dieren, zo laag mogelijk gehouden.</p>
	<p><b>3.4.4.3 Bepaling van infectiedosis:</b> Citaat: Op basis van eerdere resultaten kan worden verwacht dat het aantal gebruikte proefdieren en dosisgroepen voldoende is, maar niet disproportioneel, om in tweetaal de experimenten te bepalen welke dosis moet worden gebruikt voor challenge in vervolgstudies met reproduceerbare resultaten. Om te voorkomen dat frequent nieuwe batches van een muis-geadapteerd virus in muizen moeten worden getest, worden steeds stocks geproduceerd die voldoende zijn voor minstens 5 jaar experimenteel onderzoek.</p>

	<p><b>3.4.4.4 Bepaling van dynamische bereik influenzamodel:</b> Citaat: Op basis van eerdere resultaten kan worden verwacht dat het aantal gebruikte proefdieren en dosisgroepen voldoende is, maar niet disproportioneel, om in één experiment te bepalen of de 0% en 100% beschermingscontroles (=definitie dynamisch bereik) aan de verwachting voldoen.</p>
	<p><b>3.4.4.5 Aandeel antilichaam component:</b> Citaat: De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de te verwachten bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere doelstellingen in 1 experiment vastgesteld worden, zodat op controle groepen bespaard kan worden. Bijvoorbeeld experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt gecombineerd met type 5 (aandeel antilichaam component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controle groepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo is het mogelijk om het totale aantal gebruikte dieren binnen het project te verminderen.</p>
	<p><b>3.4.4.6 Aandeel cellulaire component:</b> Citaat: De benodigde groepsgrootte wordt bepaald op basis van de resultaten van voorgaande experimenten, waarbij rekening wordt gehouden met de verwachte bescherming van het vaccin en de uniformiteit van de respons van de muizen op de challenge infectie. Indien mogelijk worden experimenten zodanig opgezet dat meerdere vragen in 1 experiment kunnen worden beantwoord, zodat op controlegroepen bespaard kan worden. Bijvoorbeeld: experiment type 1 (vaccinatie/challenge) wordt gecombineerd met type 6 (aandeel cellulaire component). De negatieve (onbehandelde) en positieve (antilichaam behandelde) controlegroepen kunnen dan worden gebruikt in de analyse van beide experimenten. Zo is het mogelijk om het totale aantal gebruikte dieren binnen het project te verminderen.</p>
	<p><b>3.4.4.7 Invloed bestaande immuniteit:</b> Citaat: Voordat vaccinkandidaten in dit type experiment getest worden, om te bepalen of bestaande immuniteit een complicatie zal zijn bij de toepassing van dat vaccin, zullen deze vaccins de leidende kandidaten zijn en waarschijnlijk geselecteerd zijn voor humane trials, na een gehele selectieproces binnen het project. Deze experimenten zullen hierdoor naar verwachting laag in frequentie zijn. Hiernaast wordt het aantal benodigde dieren in de experimenten uitvoerig statistisch doorgerekend, om enerzijds het aantal dieren te beperken, maar tegelijkertijd wel meer zekerheid te krijgen dat de gegevens die uit het experiment komen bruikbaar zijn om conclusies uit te trekken (en om zo te voorkomen dat experimenten herhaald moeten worden).</p>



Verfijnen	
	<p><b>3.4.4.1 Vaccinatie/challenge experiment:</b> Citaat: De data gegenereerd in de experimenten worden uitvoerig statistisch geanalyseerd. Er worden voortdurend interstudie-analyses en trendanalyses over de verschillende experimentreeksen uitgevoerd om het inzicht in de muismodellen te vergroten en de waargenomen vaccineffecten te kunnen interpreteren. De uitkomsten van deze analyses spelen een belangrijke rol bij het ontwerp van vervolgentoelagen. Om deze reden is de noodzaak groot om de variatie binnen en tussen experimenten zo veel mogelijk te beperken. Hierom worden alleen vrouwelijke dieren gebruikt binnen deze experimenten.</p>
	<p><b>3.4.4.2 Virusadaptatie in muis:</b> Citaat: Door ervaringen uit voorgaande adaptatie experimenten, met name t.a.v. de vereiste initiële dosis, is de kans op een succesvolle, snelle adaptatie sterk toegenomen.</p>
	<p><b>3.4.4.3 Bepaling van infectiedosis:</b> Citaat: Het influenza muismodel is in de wetenschappelijke wereld geaccepteerd als geschikt model voor het testen van vaccins en antivirale middelen voor toepassing in de mens in de eerste fase van het onderzoek. De ervaring met dit type experimenten heeft geleerd welke dosisreeks het beste kan worden getest om voor het vervolgonderzoek direct bruikbare resultaten op te leveren.</p>
	<p><b>3.4.4.4 Bepaling van dynamische bereik influenzamodel:</b> Citaat: Het influenza muismodel is in de wetenschappelijke wereld geaccepteerd als geschikt model voor het testen van vaccins en antivirale middelen voor toepassing in de mens in de eerste fase van het onderzoek. Binnen het instituut wordt al meer dan tien jaar intensief gewerkt met influenza muismodellen, waarvan de meesten binnen het instituut zijn ontwikkeld. We hebben deze modellen in het beginstadium uitgebreid geëvalueerd en zo goed mogelijk gestandaardiseerd en zijn nu in staat om consistente uitkomsten te produceren.</p>
	<p><b>3.4.4.5 Aandeel antilichaam component:</b> Citaat: De data gegenereerd in de experimenten worden uitvoerig statistisch geanalyseerd. Er worden voortdurend interstudie-analyses en trendanalyses over de verschillende experimentreeksen uitgevoerd ter vergroting van het inzicht in de muismodellen en de werking van de vaccins (voorbeelden daarvan zijn eerder besproken met de DEC). De uitkomsten van deze analyses spelen een belangrijke rol bij het ontwerp van vervolgentoelagen.</p>

	<b>3.4.4.6 Aandeel cellulaire component:</b> Citaat: De data gegenereerd in de experimenten worden uitvoerig statistisch geanalyseerd. Er worden voortdurend interstudie-analyses en trendanalyses over de verschillende experimentreeksen uitgevoerd ter vergroting van het inzicht in de muismodellen (voorbeelden daarvan zijn eerder besproken met de DEC). De uitkomsten van deze analyses spelen een belangrijke rol bij het ontwerp van vervolggexperimenten.
	<b>3.4.4.7 Invloed bestaande immuniteit:</b> Citaat: Het influenza muismodel is in de wetenschappelijke wereld geaccepteerd als geschikt model voor het testen van vaccin en medicijnen voor toepassing in de mens. Binnen het instituut wordt er al meer dan tien jaar intensief gewerkt met influenza muismodellen, waarvan er een groot aantal binnen het instituut ontwikkeld zijn, voor het doel om anti-influenza methodes te onderzoeken.
<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.4.1 Vaccinatie/challenge experiment	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Virusadaptatie in muis	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.3 Bepaling van infectiedosis	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.4 Bepaling van dynamische bereik influenzamodel	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.5 Aandeel antilichaam component	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.6 Aandeel cellulaire component	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.7 Invloed bestaande immuniteit	Ja	volgens de richtlijn.

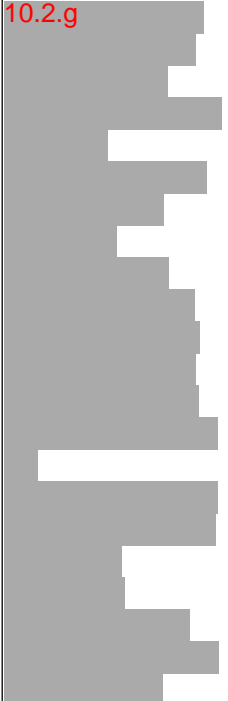
<b>Naam proef</b>		

<p><b>3.4.4.1 Vaccinatie/challenge experiment</b></p>	<p>HEP: Citaat: In de ongevaccineerde negatieve modelcontrole groep (PBS): 80-100% en in de gevaccineerde groepen: gemiddeld 30%. Er zijn soms vaccins die minder goed werken dan verwacht, dan reageren de dieren in het ergste geval bijna gelijk aan ongevaccineerde dieren. Er zijn ook vaccins die perfect beschermen, waardoor de dieren helemaal geen ongerief ondervinden van de influenza infectie. De antilichaam behandelde modelcontrole dieren: 0% kans: het antilichaam geeft volledige bescherming.</p>	<p>Citaat: Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), <a href="#">10.2.g</a></p> <p>Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (=HEP). De tijdsduur van de fase waarin muizen een score 4 krijgen is over het algemeen kort.</p>
<p>Muizen (Mus musculus)</p>	<p>Ongerief: 20,0% Ernstig 60,0% Matig 20,0% Licht</p>	

<p><b>3.4.4.2 Virusadaptatie in muis</b></p>	<p>HEP: Citaat: Het gaat waarschijnlijk om 1 of 2 sets van 3 muizen per adaptatie, want alleen bij de laatste ronde van het adaptatie proces zal virus virulent zijn in de muis. Totale maximale aantal muizen over looptijd van 5 jaar: 10 adaptaties, 2 sets van 3 muizen = <math>10 \times 2 \times 3 = 60</math> muizen.</p>	<p>Citaat: Muizen die langere tijd worden gevolgd (zie onder I) kunnen ernstige klinische verschijnselen ontwikkelen. Ze worden geëuthanaseerd bij score 4 = 10.2.g [redacted] De tijdsduur van de fase waarin muizen een score 4 krijgen is over het algemeen kort.</p>
<p>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</p>	<p>Ongerief: 4,8% Ernstig 2,4% Matig 92,8% Licht</p>	

<b>3.4.4.3 Bepaling van infectiedosis</b>	HEP: Citaat: Naarmate de dosis virus hoger is, zal het ongerief dat de dieren ondervinden toenemen. In de 1 of 2 groepen blootgesteld aan de hoogste doses gaat het om 90-100% van de dieren in experimentele groep die de HEP bereiken. Bij lagere doses zal dit percentage evenredig meer of minder sterk afnemen, afhankelijk van de virusstam. In de laagste dosisgroep kan matig tot ernstig ongerief worden verwacht bij 0-20% van de dieren.	Zie bijlage 3.4.4.1
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 20,0% Ernstig 80,0% Matig	

<b>3.4.4.4 Bepaling van dynamische bereik influenzamodel</b>	HEP: Citaat: Naar verwachting zullen de antilichaam-behandelde groepen 0% kans hebben, want deze zijn volledig beschermd. De PBS-behandelde groepen hebben 80%-100% kans.	Zie bijlage 3.4.4.1
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 50,0% Ernstig  50,0% Licht	
<b>3.4.4.5 Aandeel antilichaam component</b>	HEP: Citaat: Deel I: 0% van de dieren. Deel II: De serum of plasma behandelde dieren tonen meer variatie: van 0% tot 100%, afhankelijk van het beschermend vermogen van het overgedragen serum of plasma. Negatieve controlegroep: 80-100% kans. Antilichaam controle groep: 0% kans, het antilichaam geeft volledige bescherming.	Zie bijlage 3.4.4.1

Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 20,0% Ernstig 60,0% Matig 20,0% Licht	
<b>3.4.4.6 Aandeel cellulaire component</b>	<p>HEP: Citaat: Dieren in een vroeger stadium euthanaseren zal de resolutie van de experimenten enorm doen afnemen. Het komt namelijk veelvuldig voor dat dieren met een klinische score 3 weer herstellen en score 1 of 0 halen. De</p> <p>10.2.g</p> 	Zie bijlage 3.4.4.1

Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 20,0% Ernstig 60,0% Matig 20,0% Licht	
<b>3.4.4.7 Invloed bestaande immuniteit</b>	HEP: Citaat: In de ongevaccineerde controle groep 80-100% en in de gevaccineerde groepen gemiddeld 50%. De antilichaam behandelde controle dieren: 0% kans, het antilichaam geeft volledige bescherming.	Zie bijlage 3.4.4.1
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 20,0% Ernstig 60,0% Matig 20,0% Licht	

## 5 Samenvatting

11.1

De aanvrager maakt gebruik van alleen vrouwelijke dieren. Zowe 11.1

Er wordt geen gebruik gemaakt van pijnbestrijding omdat dit de resultaten van de proef zal beïnvloeden. 11.1

De DEC stelt de volgende voorwaarde op te nemen in de beschikking:  
De IvD laten toezien of 2x per dag observeren voldoende is om invulling te geven aan de humane eindpunten.



11.1 [redacted].

11.1 [redacted].

**6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

11.1 [redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted].

*Ter informatie*

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

## **8 Concept beschikking voor akkoord CCD**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

info@zbo-ccd.nl

Betreft: Advies AVD20185285 na aanvullende informatie aanvrager

In de CCD vergadering van 3 augustus 2018 is de projectvergunningaanvraag met als titel 'Ontwikkeling van influenza vaccines' besproken.

### Beslissing

De aanvraag is een vervolg op een aanvraag van een andere vergunninghouder 10.2.g die stopt met het uitvoeren van dit soort studies. Het betreft 10.2.g

11.1

2. Daarnaast was de reactie van de aanvrager op de gestelde vraag naar een nadere onderbouwing van het aantal dieren nog niet ontvangen. 11.1

De aanvraag werd aangehouden.

#### 1. Humane eindpunten

De humane eindpunten in onderliggende aanvraag zijn als volgt beschreven: CITAAT *Muizen worden dagelijks beoordeeld volgens een score systeem (zie onder A), waarbij 3* 10.2.g

. Mocht blijken dat deze observatie/controle frequentie niet hoog genoeg, zal deze in overleg met biotechnici worden aangepast om de naleving van de HEP's te garanderen. Bij score = 4 wordt de muis geëuthanaseerd (=HEP). De tijdsduur van de fase waarin muizen een score 4 krijgen is over het algemeen kort.

10.2.g

CITAAT *If an animal has shown lethargy in four previous occasions (clinical observations are performed on the a.m. and p.m. time point), the animal will be sacrificed. In addition, if animals show unexpected severe levels of discomfort, which are not related to influenza infection, the animals will be sacrificed to minimize discomfort for that animal.*

En in een eerdere aanvraag van een nog andere aanvrager (AVD20171364; Ontwikkeling van een universeel griep vaccin: evaluatie van de bescherming opgewekt door vaccin kandidaten):

*CITAAT: During the immunization period, generic humane endpoints used for all studies conducted at the facility will be used: If animals show unexpected clinical signs of more than minor discomfort during the pre-challenge immunization period, regardless of their cause, which is expected to last more than 1 day, these animals will be euthanized timely to avoid unnecessary suffering.*

*After 10.2.g virus mice will be scored daily based on clinical observations (model-specific clinical scores): 0 = no clinical signs, 1 = rough coat, 2 = rough coat, less reactive, passive during handling, 3 = rough coat, rolled up, labored breathing, passive during handling, 4 = rough coat, rolled up, labored breathing, unresponsive. Humane endpoint for challenge experiments is reached at clinical score 4, which is defined by rough coat, rolled up, labored breathing and unresponsiveness to external stimuli. Animals that reach clinical score 4 will be euthanized immediately and scored as dead.*

*10.2.g implemented and used this scoring system since the start of influenza challenge experiments*

En:

*CITAAT: During serial passaging and after challenge with a lethal dose of influenza virus mice will be scored for clinical symptoms daily: 0 = no clinical signs, 1 = rough coat, 2 = rough coat, less reactive, passive during handling, 3 = rough coat, rolled up, labored breathing, passive during handling, 4 = rough coat, rolled up, labored breathing, unresponsive. Humane endpoint for challenge experiments is reached at clinical score 4, which is defined by rough coat, rolled up, labored breathing and unresponsiveness to external stimuli. Animals that reach clinical score 4 will be euthanized immediately and scored as dead.*

*We implemented and used this scoring system since the start of 10.2.g experiments approximately 10.2.g ago and have gained 10.2.g with it. Animals that reach clinical score 4 experience severe discomfort. However, in our experience this humane endpoint most closely reflects the scientific endpoint (protective efficacy) as we routinely observe that mice with the less severe clinical score 3 (or even clinical scoring of 3 at multiple days) can recover. Using clinical score 3 as humane endpoint therefore could obscure protective efficacy of treatments 10.2.g in this particular case) and consequently increases cumulative discomfort for all animals involved in the experiment. In our view, the humane endpoint used therefore balances collecting the intended information on protective efficacy with the discomfort experienced by the animals. If there is any doubt regarding the health of a mouse, the attending veterinarian will be consulted.*

11.1

## 2. Onderbouwing dieraantallen

Op 20 augustus 2018 heeft de aanvrager aanvullende informatie verstrekt betreffende de onderbouwing van de dieraantallen, zie vergaderstuk CCD20185285g.

De aanvrager heeft een uitgebreide onderbouwing van het aantal dieren gegeven, en heeft aangegeven deze nog te zullen verwerken in de verschillende bijlagen dierproeven (vanwege technische problemen nu nog niet mogelijk). 11.1

11.1

**Voorstel Secretariaat**

11.1



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

10.2.e

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD4010020185285

**Bijlagen**

1

Datum 30 augustus 2018

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e

Op 5 april 2018 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van influenza vaccines" met aanvraagnummer AVD4010020185285. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 30 augustus 2018 tot en met 1 mei 2023.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

*Voorwaarden*

Aan de vergunning hebben wij voorwaarde(n) verbonden op grond van artikel 10a1 lid 2 van de wet. Deze voorwaarde(n) vindt u in het deel 'Projectvergunning' van dit besluit. Onder 'Overwegingen' lichten wij toe waarom wij deze voorwaarde(n) aan de vergunning verbinden.

## **Procedure**

**Datum:**

30 augustus 2018

**Aanvraagnummer:**

AVD4010020185285

### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie (DEC) DEC Wageningen UR. Dit advies is ontvangen op 10 juli 2018. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 24 juli 2018 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op onderbouwing van de aantallen dieren. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

## **Overwegingen**

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Beoordeling achteraf is nodig vanwege ernstig ongerief bij de dieren.

### *Voorwaarden*

De voorwaarde van het extra toezicht van de IvD wordt gesteld omdat in de aanvraag staat beschreven dat het ziekteproces zich snel kan ontwikkelen. Hierdoor kan er, door het snelle verloop van de ziekte, met enkel twee controles per dag een humaan eindpunt gemist worden. Middels deze voorwaarde worden de 3 V's gewaarborgd.

### *Beoordeling achteraf*

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d en artikel 10a1 lid 3 van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2024 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

## **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.

**Datum:**  
30 augustus 2018  
**Aanvraagnummer:**  
AVD4010020185285

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 deze:

**10.2.g**

drs. F. Braunstahl  
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: Stichting Wageningen Research

Adres: Postbus 59

Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN

Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 30 augustus 2018 tot en met 1 mei 2023, voor het project "Ontwikkeling van influenza vaccines" met aanvraagnummer AVD4010020185285, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 5 april 2018
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 10 juli 2018;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.4.1 Vaccinatie/challenge experiment, zoals ontvangen op 10 juli 2018;
    - 3.4.4.2 Virusadaptatie in muis, zoals ontvangen op 10 juli 2018;
    - 3.4.4.3 Bepaling van infectiedosis, zoals ontvangen op 10 juli 2018;
    - 3.4.4.4 Bepaling van dynamische bereik influenzamodel, zoals ontvangen op 10 juli 2018;
    - 3.4.4.5 Aandeel antilichaam component, zoals ontvangen op 10 juli 2018;
    - 3.4.4.6 Aandeel cellulaire component, zoals ontvangen op 10 juli 2018;
    - 3.4.4.7 Invloed bestaande immuniteit, zoals ontvangen op 10 juli 2018;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 10 juli 2018;
  - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 10 juli 2018
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 augustus 2018.

**Aanvraagnummer:**  
AVD4010020185285

<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort/ Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Ernst</b>
<b>3.4.4.1 Vaccinatie/challenge experiment</b>			
	Muizen (Mus musculus)	31.500	20,0% Ernstig 60,0% Matig 20,0% Licht
<b>3.4.4.2 Virusadaptatie in muis</b>			
	Muizen (Mus musculus)	1.246	4,8% Ernstig 2,4% Matig 92,8% Licht
<b>3.4.4.3 Bepaling van infectiedosis</b>			
	Muizen (Mus musculus)	1.350	20,0% Ernstig 80,0% Matig
<b>3.4.4.4 Bepaling van dynamische bereik influenzamodel</b>			
	Muizen (Mus musculus)	600	50,0% Ernstig  50,0% Licht
<b>3.4.4.5 Aandeel antilichaam component</b>			
	Muizen (Mus musculus)	6.750	20,0% Ernstig 60,0% Matig 20,0% Licht
<b>3.4.4.6 Aandeel cellulaire component</b>			
	Muizen (Mus musculus)	4.500	20,0% Ernstig 60,0% Matig 20,0% Licht
<b>3.4.4.7 Invloed bestaande immuniteit</b>			
	Muizen (Mus musculus)	2.250	20,0% Ernstig 60,0% Matig 20,0% Licht

### **Voorwaarden**

*Beoordeling achteraf*

**Aanvraagnummer:**

AVD4010020185285

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 mei 2024 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.

*Bijzondere voorwaarden*

De IvD moet erop toezien of 2x per dag observeren van de dieren voldoende is om invulling te geven aan de humane eindpunten. Wanneer dit niet het geval blijkt dan moeten er vaker controles worden uitgevoerd.

*Ter informatie*

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



**Aanvraagnummer:**

AVD4010020185285

## 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:**

AVD4010020185285

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

**Einde van een dierproef**

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

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

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

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

**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.