

gebruikt worden. Daar waar richtlijnen het gebruik van een bepaald geslacht voorschrijven zullen de betreffende richtlijnen gevolgd worden. De DEC is van oordeel dat het voor de hand ligt dat vaccins die bijvoorbeeld bedoeld zijn voor dieren die lacteren of drachtig zijn, getest worden in de vrouwelijke doeldieren. In het geval van muizen, konijnen hamsters en cavia's verdient het (op grond van eerdere ervaringen) de voorkeur om alleen met vrouwelijke dieren te werken om vechten bij mannelijke dieren te voorkomen. De mannelijke dieren solitair huisvesten, zodra het vechten zich voordoet, is geen acceptabele oplossing, omdat het vaak langdurige experimenten betreft en de dieren dan lang alleen zitten en dus aanzienlijk ongerief ondervinden. Ook kan het tijdens de proef wijzigen van de huisvestingsomstandigheden van (een deel van) de dieren de resultaten beïnvloeden. Vechten kan daarnaast leiden tot extra uitval van dieren en mislukken van de experimenten.

Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.

- 19.** Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

In het project zullen de meeste (maar niet alle) dieren worden gedood aan het einde van het experiment. Hergebruik is in principe niet mogelijk, omdat blootstelling aan vaccins en ziekteverwekkers de resultaten van volgende, vergelijkbare testen kan beïnvloeden. Ook kunnen dieren die met ziekteverwekkers geïnfecteerd zijn (geweest) een gevaar vormen voor hun omgeving of het milieu. De aanvrager heeft een adoptieprogramma voor de herplaatsing van dieren die geschikt zijn als huisdier of gezelschapsdier. In de praktijk lukt dit in een zeer groot deel van de gevallen. De aanvrager gebruikt methoden die beschreven zijn in Bijlage IV van de richtlijn 2010/63/EU.

Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.

- 20.** Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. In alle gevallen waarin het niet noodzakelijk is om de gebruikte landbouwhuisdieren te doden (zie criteria onder C19), wordt de mogelijkheid van hergebruik actief onderzocht. In veel gevallen wordt hergebruik ook gerealiseerd of gaat het dier terug naar de leverancier.

Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.

NTS

- 21.** Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en is duidelijk geformuleerd.

DE NTS is aangepast aan de wijziging.

D. Ethische afweging

Rechtvaardigt het belang van het doel van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn,

ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

Voor het merendeel van de dieren () die gebruikt worden in de voorgestelde experimenten leiden de experimenten tot licht () of matig () ongerief en een beperkte aantasting van hun integriteit. Als de werkzaamheid van de vaccins wordt getest kan dit voor een kleiner deel van de dieren (10.1 c en 10.2 g) leiden tot ernstig ongerief. De onderzoekers doen deze proeven slechts als er geen wettelijk geaccepteerd alternatief voorhanden is. De duur en de ernst van het ongerief worden door de onderzoekers zoveel mogelijk beperkt. Daar staat tegenover dat de doeldieren en hun eigenaren er belang bij hebben dat er alleen goed werkende, veilige vaccins op de markt zijn die voldoen aan gestelde kwaliteitseisen. Het betreft gezondheidsbelangen van de doeldieren, en economische en emotionele belangen van de eigenaren. Ook de samenleving als geheel heeft er belang bij dat vaccins goed werken, veilig zijn en geen gevaar vormen voor mens, dier en milieu. De DEC kent met name aan deze aspecten, bescherming van de gezondheid van de doeldieren en bescherming van mens, dier en milieu tegen de risico's van onveilige vaccins, veel gewicht toe.

De aanvrager heeft verder een (10.1 c en 10.2 g) belang bij het op de markt kunnen brengen van de te testen vaccins en kan dit alleen doen als hij door middel van de voorgestelde dierproeven aantoonst dat ze werkzaam en veilig zijn. Het gaat om wettelijk verplicht onderzoek.

De DEC acht de economische belangen van de aanvrager en van de dierhouders op zich legitiem en zij leggen zeker enig gewicht in de schaal, maar alleen in combinatie met het grote maatschappelijk belang en de terechte wens om doeldieren, eigenaren en de samenleving te beschermen tegen de gevaren van onveilige of niet goed werkende vaccins, rechtvaardigen ze het gebruik van de dieren in de experimenten.

De aanvrager heeft verhelderd waarom de extra dieren voor de nog resterende periode nodig zijn om de vereiste doelen te halen en heeft dit extra onderbouwd via het antwoord op de door de DEC gestelde vraag.

- 3.** Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De DEC is op grond van het bovenstaande overtuigd van het belang van de doelstellingen beschreven in het projectvoorstel "In-vivo Quality Control tests in the (10.1 c en 10.2 g)". Volgens de DEC wegen de voordelen voor de doeldieren, de samenleving, de aanvrager en de houders van de dieren zwaarder dan de nadelen voor de gebruikte proefdieren. Het project is goed opgezet. Verder is de DEC van mening dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om te kunnen voldoen aan de 3V beginselen en dat de aanvrager ervoor zal zorgen dat het ongerief van de proefdieren zoveel mogelijk beperkt zal worden. Gelet op het bovenstaande is de DEC unaniem van mening dat voldaan is aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend. *De DEC ziet geen reden om tot een andere afweging te komen door toevoeging van 10 extra schapen*

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

X De DEC adviseert de vergunning *op het amendement (5)* te verlenen onder de volgende voorwaarden

X Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD. *Dit advies blijft overeind met de voorgestelde wijzigingen*

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

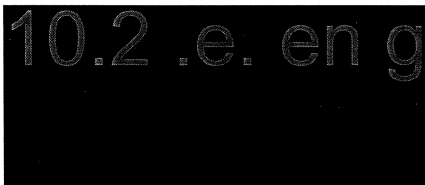
De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. *Het advies voor dit amendement is unaniem tot stand gekomen.*

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*). *Er zijn bij de bespreking van het amendement geen knelpunten of dilemma's naar voren gekomen naast het punt waarover een vraag is gesteld.*



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD-10.2.e.en.g-20173044-7
Bijlagen
3

Datum 18 december 2020
Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 9 oktober 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In-vivo Quality Control tests for vaccines in the Quality Control Operations Department" met aanvraagnummer AVD-10.2.e.en.g-20173044-7. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf de datum van deze brief is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning is afgegeven voor de periode van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarden verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Terugkoppeling

Gedurende de looptijd van de vergunning moet u jaarlijks aan de CCD terugkoppelen welk type/klasse/soort teststof/geneesmiddel / welke type

dierproef / wijze van uitvoering / welke diersoort en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 15 maart door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Datum:
18 december 2020
Aanvraagnummer:
AVD-20173044-7

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie **10.2 .e. en g** (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 11 november 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Terugkoppeling

Omdat uit uw aanvraag niet blijkt welke stoffen u zal gaan onderzoeken, maar de uit te voeren handelingen wel omschreven zijn, is een voorwaarde opgenomen dat u jaarlijks aan de CCD moet terugkoppelen naar welke soort stoffen onderzoek plaats heeft gevonden. Deze voorwaarde is gesteld omdat de CCD graag een beeld wil krijgen van wat voor soort stoffen/experimenten worden uitgevoerd onder deze vergunning. Op deze wijze houdt de CCD zicht op het soort experimenten dat gedaan wordt en het soort stoffen dat getest wordt.

Voorwaarden

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 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Datum:
18 december 2020
Aanvraagnummer:
AVD [REDACTED] 20173044-7

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

18 december 2020

Aanvraagnummer:

AVD 0173044-7

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

10.2.e.eng

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

10.2.e.eng

deze wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "In-vivo Quality Control tests for vaccines in the Quality Control Operations Department" met aanvraagnummer AVD^{10.2.e.eng}20173044-7, na advies van dierexperimentencommissie 10.2.e.eng DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.e.eng. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 9 oktober 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 27 september 2017;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1. Potency testing, zoals ontvangen op 27 september 2017;
 - 3.4.4.2. Batch safety testing and Extraneous Agents/Identity testing, zoals ontvangen op 27 september 2017;
 - 3.4.4.3. Acquire biological (test) materials, zoals ontvangen op 27 september 2017;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 16 augustus 2017;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 11 november 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1. Potency testing			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	57.000	5,0% Ernstig 52,0% Matig 43,0% Licht
	Cavia's (<i>Cavia porcellus</i>)	4.400	68,0% Matig 32,0% Licht
	Andere knaagdieren (andere Rodentia) / Hamster	6.400	5,0% Ernstig 67,0% Matig 28,0% Licht
	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	14.200	31,0% Matig 69,0% Licht
	Kippen	55.500	13,0% Ernstig 5,0% Matig 82,0% Licht
	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	100	100,0% Matig

Aanvraagnummer: AVD XXXXXXXXXX 20173044-7

	Honden (Canis familiaris)	40	100,0% Licht
3.4.4.2. Batch safety testing and Extraneous Agents/Identity testing			
	Konijnen (Oryctolagus cuniculus)	40	100,0% Licht
	Honden (Canis familiaris)	300	100,0% Licht
	Katten (Felis catus)	10	100,0% Licht
	Varkens (Sus scrofa domesticus)	6.800	100,0% Licht
	Runderen (Bos taurus)	130	100,0% Licht
	Schapen (Ovis aries)	±0 / 20	100,0% Licht
	Kippen	2.400	100,0% Licht
	Paarden, ezels en kruisingen daarvan (Equidae)	10	100,0% Licht
	Andere vogels (andere Aves) / kalkoen	20	100,0% Licht
3.4.4.3. Acquire biological (test) materials			
	Runderen (Bos taurus)	5	100,0% Licht
	Katten (Felis catus)	5	100,0% Licht
	Kippen	500	90,0% Terminaal 10,0% Licht
	Honden (Canis familiaris)	5	100,0% Licht
	Andere knaagdieren (andere Rodentia) / hamster	100	100,0% Terminaal
	Paarden, ezels en kruisingen daarvan (Equidae)	5	100,0% Licht
	Varkens (Sus scrofa domesticus)	5	100,0% Licht
	Muizen (Mus musculus)	1.000	100,0% Terminaal
	Konijnen (Oryctolagus cuniculus)	70	90,0% Terminaal 10,0% Licht
	Schapen (Ovis aries)	20	100,0% Licht
	Geiten (Capra aegagrus hircus)	5	100,0% Licht

Aanvraagnummer: AVD [REDACTED] 20173044-7

	Andere vogels (andere Aves) / kalkoen	5	90,0% Terminaal 10,0% Licht
	Cavia's (Cavia porcellus)	500	90,0% Matig 10,0% Licht

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Terugkoppeling

Gedurende de looptijd van de vergunning moet u jaarlijks aan de CCD terugkoppelen welk type/klasse/soort teststof/geneesmiddel / welke type dierproef / wijze van uitvoering / welke diersoort en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 15 maart door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid 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:

AVD  20173044-7

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

Aanvraagnummer:AVD  20173044-7

voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn 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 van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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.


Levensloopdossier

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloopdossier bijgehouden worden.

Wilde dieren

Het vangen van wilde dieren moet volgens artikel 10f van de wet door een deskundig persoon gedaan worden waarbij dieren zo min mogelijk pijn, lijden, angst of blijvende schade ondervinden. Gewonde dieren moeten onderzocht worden en behandeld, tenzij er een wetenschappelijke motivering is om niet te behandelen.

Aanvraagnummer:

AVD  020173044-7

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid 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.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2 .e. en g

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0800-7890789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD 20173044-7

Uw referentie

Bijlagen

Datum 11 februari 2020

Betreft Correctie beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 9 oktober 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In-vivo Quality Control tests for vaccines in the Quality Control Operations Department" met aanvraagnummer AVD 20173044-7.

Beslissing

Op 21 december 2020 hebben wij u de beschikking en vergunning van uw aanvraag toegezonden. De IvD heeft contact met ons opgenomen, omdat de gewijzigde vergunning niet correct is. In de vergunning staan verkeerde dieraantallen genoemd, terwijl in de aanvraag de correcte aantallen staan beschreven. Ook ontbreekt bijlage dierproeven 3.4.4.4. op de vergunning. Tot slot worden in de beschikking de verkeerde data genoemd, de verschillende formulieren zijn niet op 27 september 2017 ontvangen.

Het besluit van 21 december 2020 is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 9 oktober 2020

2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:

a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 11 november 2020;

b Bijlagen dierproeven

- 3.4.4.1. Potency testing, zoals ontvangen op 11 november 2020;
- 3.4.4.2. Batch safety testing and Extraneous Agents/Identity testing, zoals ontvangen op 11 november 2020;
- 3.4.4.4. Addition for potency testing and residual toxicity testing, zoals ontvangen op 11 november 2020;

c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 11 november 2020;

d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 11 november 2020.

Zoals in de beschikkingsbrief van 21 december 2020 genoemd, hebben wij uw aanvraag beoordeeld. Bij de beoordeling van uw aanvraag hebben wij het aantal dieren zoals genoemd in uw aanvraag en de aanpassingen in bijlage 3.4.4.4. meegenomen. De aan u verstuurd vergunning bevat dus een kennelijke verschrijving en kan gecorrigeerd worden naar de gegevens in onderstaande tabel.

Naam proef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1. Potency testing			
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	57000	5,0% ernstig 52,0% matig 43,0% licht
	Cavia's (<i>Cavia percellus</i>)	4400	68,0% matig 32,0% licht
	Andere knaagdieren (andere Rodentia)/Hamster	6400	5,0% ernstig 67,0% matig 28,0% licht
	Konijnen (<i>Cryptolagus cuniculus</i>)	14200	31,0% matig 69,0% licht
	Kippen	55500	13,0% ernstig 5,0% matig 82,0% licht
	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	100	100% matig
	Honden (<i>Canis familiaris</i>)	40	100% licht
3.4.4.2. Batch safety testing and Extraneous Agents/Identity testing			
	Konijnen (<i>Cryptolagus cuniculus</i>)	40	100% licht
	Honden (<i>Canis familiaris</i>)	300	100% licht
	Katten (<i>Felis catus</i>)	10	100% licht
	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	6800	100% licht
	Runderen (<i>Bos taurus</i>)	130	100% licht
	Schapen (<i>Ovis aries</i>)	10 /20	100% licht
	Kippen	2400	100% licht
	Paarden, ezels en kruisingen daarvan (<i>Equidae</i>)	10	100% licht
	Andere vogels (andere Aves) / kalkoen	20	100% licht
3.4.4.3. Acquire biological (test) materials			
	Runderen (<i>Bos taurus</i>)	15	100% licht
	Katten (<i>Felis catus</i>)	5	100% licht
	Kippen	1000	90% terminaal 10% licht
	Honden (<i>Canis familiaris</i>)	5	100% licht
	Andere knaagdieren	100	100% terminaal

Datum
11-02-2021

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD-20173044-7

	(andere Rodentia) / hamsters		
	Paarden, ezels en kruisingen daarvan (Equidae)	5	100% licht
	Varkens (Sus scrofa domesticus)	15	100% licht
	Muizen (Mus musculus)	1000	100% terminaal
	Konijnen (Oryctolagus cuniculus)	150	90% terminaal 10% licht
	Schapen (Ovis aries)	20	100% licht
	Geiten (Capra aegagrus hircus)	5	100% licht
	Andere vogels (andere Aves) / kalkoen	5	90% terminaal 10% licht
	Cavia's (Cavia porcellus)	1000	90% matig 10% licht
3.4.4.4. Addition for potency testing and residual toxicity testing			
	Muis (Mus musculus)	12800	50% matig 50% ernstig
	Cavia (Cavia porcellus)/potency test	8500	60% matig 40% ernstig
	Cavia(Cavia porcellus)/ residual toxicity test	2800	100% matig
	Konijn (Oryctolagus cuniculus)	9100	100% licht

Voor het overige blijft het besluit van 21 december 2020 ongewijzigd.
Deze brief dient u bij uw vergunning te voegen.

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 gegevens in het colofon.

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.

Datum
11-02-2021

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD  20173044-7

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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0800-7890789.

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g

Drs. F. Braunstahl



Centrale Commissie Dierproeven



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for 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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2 .e. en g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2 .e. en g

1.3 Provide the title of the project.

Development of new poultry vaccines

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

Basic research

Translational or applied research

Regulatory use or routine production

Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare

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.

Rationale

Rationale

10.2 .e. en g

Worldwide more than fifty billion chickens are kept for meat and egg production and approximately six billion of these live in Europe. Vaccination is perhaps the single most important measure that can be taken to ensure these animals remain healthy by harnessing the chickens' immune system to combat infectious diseases, thus significantly reducing the amount of antibiotics and increasing animal welfare. The **10.2.e.en.g** is continuously working to improve its chicken's vaccines and where possible develop new ones that can be used all over the world. As each pathogen has its own specific mechanism of causing disease in a host and may require either humoral or cellular immunity (or both) to be controlled, new vaccines are by consequence to a large extent "tailor-made". Of course, knowledge acquired with other pathogens/ vaccines will be used to design candidate vaccines in order to increase the likelihood of success and thereby minimize the numbers of animals needed during the whole development process of a new vaccine. Vaccines can be either (components of) inactivated pathogenic microorganisms or viruses that are normally formulated together with an adjuvant and that primarily induce a humoral response, or live attenuated/apathogenic microorganisms or viruses that can induce both a humoral and cellular response. The attenuation of live vaccines can be accomplished by **10.1.c.en.10.2.g** (). Also the development of **10.1.c.en.10.2.g** vaccines is important to enable vaccination against **10.1.c.en.10.2.g**, thus **10.1.c.en.10.2.g** needed and thereby increasing animal welfare.

Most vaccines are given to animals that are facing the risk of being infected by a pathogen themselves but for some diseases, especially the ones that occur shortly after hatch, the chickens are vaccinated before onset of lay in order to protect its offspring by the transfer of antibodies via the egg yolk. The two key requirements of any vaccine are (i) that it is safe, and (ii) that it is efficacious. As vaccination is a medical treatment that is administered to healthy individuals, then apart from some transient minor discomfort, it is important that no harm is done. With regard to efficacy, unless a vaccine can be shown to have benefit in providing protection from disease and/or infection its use cannot be justified. To demonstrate safety and efficacy of vaccines and to develop vaccine quality control tests, animal experiments have to be undertaken.

Vaccine development

The life cycle of veterinary vaccines can be divided into three basic phases: a research stage, a development stage and a life cycle management stage. The aim of the research phase is to identify new pathogens or expand the knowledge of a known pathogen, and design and test candidate vaccines. Knowledge of the pathogen is used to assess possible protective antigens and/or live vaccine candidates that are tested in feasibility studies to investigate which level of efficacy and safety can be attained. This will indicate if a candidate vaccine can fulfil the efficacy and safety requirements that have been laid down in EU directives, the Pharmacopoeia Europaea (Ph.Eur.) and guidelines and regulations of the European Medicines Agency and other international regulatory bodies. The research phase will be described in a separate application.

Vaccine development phase

Once the research phase has identified a vaccine candidate that can fulfil the required efficacy and safety criteria, the development phase can begin. The components for the potential vaccine and the challenge models to demonstrate vaccine efficacy are at this stage established and animal studies are performed that will be part of the registration dossier that is submitted to the regulatory authorities. Batches of the new vaccine are produced and used to demonstrate the vaccine safety and efficacy in line with regulatory standards to meet the requirements of the regulatory authorities. Once the registration dossier has been submitted, additional studies may be requested by the regulatory authorities during the licensing procedure.

Vaccine life cycle management

For most vaccines, registration and launch of the product is not the end of the R&D input. There is continued development and improvement to update product characteristics (life cycle management). The **10.2.e.en.g** has a wide range of registered combined and single vaccines against pathogens described below.

Studies are performed for the life cycle management of these registered vaccines. This can involve studies to evaluate **10.1.c.en.10.2.g** or **10.1.c.en.10.2.g** the addition of **10.1.c.en.10.2.g** (e.g. for the **10.1.c.en.10.2.g** or **10.1.c.en.10.2.g**), improvements to **10.1.c.en.10.2.g** and/or associated **10.1.c.en.10.2.g**, inclusion of additional antigens and changes in **10.1.c.en.10.2.g**. Furthermore studies are performed to generate key information for the end user, which includes evaluation of protection against **10.1.c.en.10.2.g** isolates, vaccine take and supportive information of

vaccination protocols including comparison of the performance of different vaccines in the market (using both [REDACTED] and competitor vaccines).

Compatibility studies are performed in line with the regulations (EMA/CVMP/IWP/594618/2010) to demonstrate that different vaccines can be used together. This already involves studies during development of new products (e.g. compatibility of our [REDACTED] and [REDACTED] vaccines and [REDACTED] with our [REDACTED] vaccines) or studies post licensing (e.g. compatibility of our [REDACTED] vaccines with the [REDACTED] and [REDACTED] vaccines, etc).

Instances of addition of label claims, are for example the addition of a new administration route; for example, [REDACTED] with [REDACTED].

Improvements of the [REDACTED] and [REDACTED] are continuously ongoing to increase [REDACTED] and to have better and more animal friendly methods. In case these improvements can have a significant impact on safety and efficacy in line with the regulations, safety and efficacy studies in chickens will need to be performed.

To further support the life cycle management, studies are also performed with our products to demonstrate their efficacy against new pathogen strains or strains from other geographical regions. Also studies for vaccine take are performed. The aim of these studies is to determine what is the correct sampling after vaccination (which tissues, timing, etc), so samples are obtained which can be reliably tested to determine whether vaccination was successful or not. Result of such testing will provide valuable information on e.g. correct storage of the vaccine and correct vaccine application. Studies for supportive information for vaccination protocols are performed to evaluate correct vaccination timing and level of protection which can be expected from different (novel) vaccines in the market. In these studies, competitor vaccines / competitor vaccination schedules can also be included. Information from these studies will provide important information to advise customers (veterinarians and poultry farmers) on correct vaccination strategies globally.

The current project proposal covers the development phase for new poultry vaccines and life cycle management for existing vaccines in which all studies are done with the final formulation ([REDACTED]).

In these studies registered vaccines (Own product or from other companies) can also be included to compare against. The research phase is covered by a separate proposal.

Poultry diseases

Chickens can be affected by a number of viral and bacterial diseases that in principle can be controlled by vaccination and/or antibiotic treatment.

Viral pathogens

AVIAN REOVIRUS

Avian Reovirus infections in chickens cause major economic problems for commercial poultry producers throughout the world. Avian Reoviruses have been associated with a variety of diseases, including viral arthritis/infectious tenosynovitis, runting and stunting (RRS) or malabsorption syndrome (MAS) resulting in growth retardation, pericarditis, myocarditis, enteritis, immunosuppression and central nervous symptoms. In the last few years, a new characterization method of Reo viruses based on sequence analysis of the serotype specific sigma C protein was developed by different R&D groups [REDACTED]. Recent outbreaks in Europe were analysed and classified by this method and it was shown that the outbreaks were divided over all groups. Vaccination programs are aimed at providing either direct immunity by live vaccination of chickens or immunization of breeders with live and or inactivated vaccines to transfer passive immunity to the progeny. For vaccination to have a chance of success, it must protect the birds at an early age.

[REDACTED]. To protect against [REDACTED]. Vaccination studies involve [REDACTED]. Safety and efficacy is evaluated; this also includes the protection in [REDACTED]. These vaccines will be commercialized in Europe and also in other parts of the world.

INFECTIOUS BURSAL DISEASE

Infectious Bursal disease (IBD), also called Gumboro disease, is an acute highly contagious viral infection

in chickens. The virus (IBDV) has lymphoid tissue as its primary target with a selective tropism for cells of the bursa of Fabricius. The morbidity rate in susceptible flocks is high, with a rapid weight loss and moderate to high mortality rates. Chickens that recover from the disease may have immune deficiencies resulting from viral replication in and subsequent destruction of cells of the bursa of Fabricius. In the US, variant IBDV strains are of major concern. In other parts of the world, very virulent classical strains are causing several clinical outbreaks associated with high mortality. In Europe new variant IBDV strains have been isolated in Greece and in Belgium from progeny suffering from Gumboro disease. These new variant IBDV strains can be distinguished from other known classical and variant IBDV strains based on their reaction pattern with monoclonal antibodies.

10.1 c en 10.2 g

are in development.

For vaccination in the hatchery (by 10.1 c en 10.2 g) vaccine development is performed for 10.1 c en 10.2 g

Safety and efficacy will be evaluated for these new vaccines; this also includes the protection in the

10.1 c en 10.2 g

These vaccines will be commercialized in Europe and also in other parts of the world.

NEWCASTLE DISEASE VIRUS

Newcastle disease virus (NDV), a member of the paramyxoviridae family, is responsible for one of the most devastating diseases in poultry resulting in a substantial economic impact in the poultry industry around the world. Clinical signs depend on the age of the host, virulence of the virus strain, its tropism and the host's immune status. Velogenic NDV strains can induce high mortality, clinical signs including listlessness, severe respiratory signs, muscular tremors, torticollis, paralysis of legs and wings, drop of egg production, etc. Mesogenic NDV strains usually cause predominantly respiratory disease. A drop in egg production and nervous signs may occur. Mortality is usually low. Lentogenic NDV strains usually cause no disease in adult birds. In young, fully susceptible birds, serious respiratory disease can be seen. In most parts of the world, chickens and turkeys are protected against NDV by vaccination. A standard NDV vaccination programme consists of a number of vaccinations with conventional live NDV vaccines (mostly starting at 1 day of age and including revaccinations approximately every 4 weeks) and a vaccination with an inactivated NDV vaccine to insure high maternally derived antibodies in the progeny before lay (14-20 weeks). Conventional live NDV vaccines can induce some respiratory signs and/or conjunctivitis that can be aggravated by secondary bacterial infections. Newcastle disease virus can be transmitted to humans and is therefore considered as a zoonotic agent.

10.2 .e. en g

Several new vaccines are now in development both for use in 10.1 c en 10.2 g

For vaccination 10.1 c en 10.2 g) vaccine development is ongoing for 10.1 c en 10.2 g

vaccine is in development.

AVIAN METAPNEUMOVIRUS (AMPV), AVIAN RHINOTRACHEITIS (ART)

Avian Rhinotracheitis (ART) is a disease initially recognized in turkeys and caused by Avian rhinotracheitis virus (ARTV), a pneumovirus classified within the Paramyxoviridae family of viruses although with a gene order different to that of other pneumoviruses. Initially the disease was called Turkey Rhinotracheitis (TRT). The virus has a characteristic pleomorphic shape and fails to haemagglutinate turkey, chicken, human and guinea pig red blood cells. Only one serotype of virus has been identified although monoclonal antibodies showed some diversity between isolates obtained in the UK and elsewhere.

The disease is widespread, having first been described in South Africa in the 1970s followed by Israel, France, Germany, England and Wales. Pneumovirus infections are currently widespread throughout Europe, South and Central America and the Middle and Far East.

The disease is characterized by snicking, tracheal rales, nasal mucoid discharge and watery eyes. Submaxillary oedema and swelling of the infraorbital sinus is usually present. There is often a drop in feed consumption. Morbidity may reach 100% whilst mortality can reach 30-50%, depending on the

10.2 .e. en g

secondary organism(s) involved and the age at the time of infection. Mycoplasma and bacteria (E. coli, Klebsiella, Staphylococci, Streptococci, Proteus spp. and Alcaligenes faecalis) have been isolated as secondary infections from outbreaks of ART. After replicating at the initial site(s) of infection, the virus can spread to the reproductive tract and in laying birds the virus can cause a severe drop in egg production of 60 to 98%. ART antigen has been detected in the magnum and isthmus after infection via the nares.

10.2 .e. en g

Vaccination studies involve 10.2 .e. en g

. Safety and efficacy will be evaluated. These vaccines will be commercialized in Europe and also in other parts of the world.

INFECTIOUS BRONCHITIS

Avian Infectious Bronchitis is an acute, highly contagious respiratory disease of chickens caused by a Coronavirus. The disease is characterised by tracheal rales, coughing, and sneezing. In addition to the respiratory signs, chickens may show urogenital symptoms and develop kidney disease and in laying flocks there is usually a drop in egg production. Infectious Bronchitis (IB) is of substantial economic importance to the poultry industry. In laying flocks the major loss is related to a decreased production and poor egg quality. Immunisation against IB has been shown to be efficacious and plays a very important role in the control of this disease.

Many serologically different strains have been found; these isolates of IBV can be grouped in serotypes, the number of types depends on the serological technique utilised in the assessment. New variants have also been occurring over the last decade. The challenge for vaccination against IB is 10.1 c en 10.2 g

Vaccination against IB is performed from day old with live vaccines and multiple vaccinations are given. Also at 14-20 weeks of age an inactivated vaccine is given to protect against IB during the laying period.

10.1 c en 10.2 g

To develop new vaccines 10.1 c en 10.2 g

) will be used to improve on the current vaccines in the market. 10.1 c en

10.1 c en 10.2 g will be development and also 10.1 c en 10.2 g

These vaccines will be commercialized in Europe and also in other parts of the world.

For existing products (10.1 c en 10.2 g) additional safety and efficacy studies are performed in line with the requirements for registration 10.2 .e. en g

EGG DROP SYNDROME

In 1976 an egg drop syndrome was described in laying hens leading to the name of the disease "egg drop syndrome '76". Since the initial description, EDS has been observed in many countries throughout the world. This syndrome is attributed to an adenovirus which is able to agglutinate chicken red blood cells, a property which has not been found for any other chicken adenovirus. By serological analysis only one serotype has been recognised. The prominent symptom is a drop in egg production which often starts before the peak production is reached. The symptom has also been observed at later stages of the laying period. In addition to the drop in egg production, thin-shelled and soft-shelled eggs, shell-less eggs or, in brown egg layers, colourless eggs, may be found. The symptoms of egg drop usually last approximately 4 to 10 weeks and egg production can be reduced by up to 40%; however, production tends to return to normal levels for the type of birds at that age. The birds may show as additional symptoms a slight diarrhoea during a few days and sometimes combs are relatively pale. Oil adjuvanted inactivated vaccines are widely used and give good protection against clinical disease and drop in egg production.

10.2 .e. en g

For the replacement of 10.1 c en 10.2 g

MAREK'S DISEASE

Marek's Disease (MD) is a highly contagious, lymphoproliferative disease of chickens and is caused by a herpesvirus known as Marek's disease virus (MDV). Three serotypes have been described: serotype 1 includes pathogenic isolates of chicken origin and their attenuated derivatives, serotype 2 includes the

naturally apathogenic isolates of chicken origin, and serotype 3 includes the naturally apathogenic isolates of turkey origin known as turkey herpesvirus (HVT). Vaccines derived from all three serotypes are available and used alone or in combinations to provide protection against MD in the field. Vaccination is performed either in ovo or in one-day-old chickens by injection.

10.2.e.eng

HVT has also become widely used as a vector vaccine. Genes from other pathogens are in that case inserted in the HVT genome resulting in an HVT vector vaccine which not only protects against MD but also against the other diseases (e.g. after insertion of the F protein of NDV, protection is also obtained against ND). The advantages of the HVT vector vaccine are: the vaccine is safe (HVT is naturally apathogenic) and both humeral and cellular immune responses against pathogens are induced. Furthermore, a lifelong duration of protection is induced as HVT remains present in the birds for life.

10.2.e.eng

In all cases the vaccine viruses are cell associated and therefore the product is presented frozen and stored at low temperature (e.g. in liquid nitrogen).

The vaccines are applied using a solvent which support stability of the live cells.

Research is both focussed on

include, update of the , update of the and studies examining which are applied in the hatchery. Furthermore, studies are done, to add (e.g. addition of).

New vaccine development involves the

) additional safety and efficacy studies are performed in line with the requirements for registration in and other countries.

INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS

Infectious laryngotracheitis (ILT) is a viral respiratory tract infection in chickens which is caused by infectious laryngotracheitis virus (ILTV) or Gallid herpesvirus 1. This virus is classified as a member of the genus Iltovirus within the family of Herpesviridae, subfamily Alphaherpesvirinae. ILT is a viral respiratory tract infection that may cause performance losses and decreased egg production.

Two forms of ILT are recognized: that is the mild and the severe ILT forms. Clinical signs associated with the mild form include (haemorrhagic) conjunctivitis, swelling of the sinuses, watery eyes, nasal discharge and mild tracheitis, The mild form results in morbidity as low as 5% and very low mortality (0.1-2%). Clinical signs associated with the severe form of the ILT virus include coughing, gasping, marked dyspnoea, respiratory depression, expectorations of bloody stained mucus. The severe form causes high morbidity (90-100%) and variable mortality (5-70%) but usually in the range of 10-20%. In the field clinical signs appear 6-12 days after infection. Experimental inoculation via the intratracheal route results in a shorter incubation period of 2-4 days. The disease often persists for as long as two to six weeks, and the virus can be latently present in a low percentage of the birds of an infected flock and might reappear after a stress period.

Prevention of ILT has been obtained by vaccines consisting of attenuated live ILTV strains of low virulence derived by serial passaging in cell culture or embryonated chicken eggs. Although highly efficacious, attenuated live ILT vaccines have been associated with some negative properties, such as spread of vaccine virus to non-vaccinates, insufficient attenuation, production of latently infected carriers and increased virulence as a result of bird-to-bird passage. Live vaccines are normally administered to chickens older than 2 weeks, as younger chickens do not respond as well and severe reactions are more likely to occur in younger chickens.

10.2.e.eng

AVIAN INFLUENZA

Avian influenza is a respiratory infectious disease caused by Avian Influenza virus (AIV), which is member of the genus Influenzavirus A belonging to the Orthomyxoviridae family. Surface proteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) are the most prominent features of the viral envelope and

are used to subtype the virus strains. Currently 18 HA and 10 NA subtypes are identified within the Influenzavirus A of which HA 1-16 and NA 1-9 can be found within the avian influenza viruses. The other subtypes have only been found in bats. AIV strains can further be classified into 2 groups: highly pathogenic avian influenza (HPAI) and low pathogenic avian influenza (LPAI). HPAI viruses are very virulent viruses in which mortality rates may approach 100% and appear to be pantropic with respect to systemic virus replication and ability to produce gross lesions. The most severe lesions result in inflammation, haemorrhage with necrosis and cellular death of skin, brain, heart, adrenal gland, pancreas and other visceral organs. Clinical signs associated with HPAI are sudden death without clinical signs, lack of energy and appetite, decreased egg production, soft-shelled or misshapen eggs, swelling of the head, eyelids, comb, wattles and hocks, purple discoloration of the wattles, combs, and legs, nasal discharge, coughing, sneezing, incoordination and diarrhoea. These viruses have been restricted to subtypes H5 and H7. Infections with H9 AI virus strains although of low pathogenicity, do have a negative influence on flock performance especially if they occur in combination with other pathogens. Outbreaks of avian influenza (AI) caused by infection with low pathogenic H9N2 viruses have occurred in poultry, resulting in serious economic losses in Asia and the Middle East. All other viruses are designated LPAI viruses causing milder infections and appear to be restricted in their capability for replication and production of lesions in individual organs and tissues. Lesions were detected in the ovary and oviduct and congestion of the lung and trachea. No or few clinical signs are observed.

10.2 .e. en g

10.2 .e. en g

the development of 10.2 .e. en g as well as improved 10.2 .e. en g in the generation of 10.2 .e. en g 10.2 .e. en g is to allow 10.2 .e. en g 10.2 .e. en g s, improved 10.2 .e. en g which will allow safe, efficacious and 10.2 .e. en g that should allow 10.2 .e. en g . The use of these vaccines 10.2 .e. en g

CHICKEN ANAEMIA VIRUS

Chicken anaemia agent (CAA, also known as CAV = chicken anaemia virus) is the causative agent of avian infectious anaemia. The only known host for CAA, an agent which appears to be ubiquitous in all major chicken producing countries of the world, is the chicken. All ages are susceptible to infection but susceptibility to disease rapidly decreases during the first 2 - 3 weeks of life. Development of age resistance is considerably delayed and morbidity as well as mortality are enhanced if chicks are dually infected with CAA and with MDV, REV or IBDV, probably due to virus induced immunosuppression. CAA spreads both vertically and horizontally in chickens.

Vertical transmission occurs following primary infection of in lay breeding stock and results in clinical disease in their progeny towards the end of the second week of their life. These birds become anorexic and depressed with pallor of the comb and wattles and ruffled feathers. The main characteristics of the disease are growth depression and increased mortality. The disease is acute. Mortality, generally between 10-20% but occasionally up to 60%, peaks within 5-6 days after onset of disease signs and mortality has often declined to normal levels after a further 5 to 6 days. Affected birds often have focal skin lesions which are prone to secondary bacterial infection leading to gangrenous dermatitis. Affected birds suffer from an anaemia with a peak at 14-16 days post hatching as indicated by hematocrit values ranging from 6-26% whereas at necropsy thymus atrophy and pale fatty bone marrow are the most predominant signs.

Horizontal spread occurs through contact with vertically infected chickens, contaminated vomites, houses, etc. and infection during the first days of life results in clinical disease as described above. Horizontal infection in older birds may result in subclinical disease but both clinical and subclinical infection cause economic losses.

The physical resistance of CAA to inactivation is relevant in context of horizontal spreading.

The presence of maternal antibody is protective in experimental infections with CAA and CAA associated disease does not appear to occur in the progeny of immune breeder flocks. Therefore, immunization of breeding stock, several weeks before onset of lay will efficiently prevent outbreaks of infectious anaemia

caused by CAA in their progeny. Furthermore, if high uniform antibody levels can be induced in breeding stock, the resulting high levels of maternally-derived antibody (MDA) may prevent or at least delay horizontal infection in the progeny and thus prevent or decrease economic losses due to disease in the first weeks of their life.

10.2.e.eng

PIGEON PARAMYXO VIRUS

In the early eighties a Paramyxovirus infection in pigeons was recognised in the Mediterranean. The disease spread north-east from Italy through Europe and to Great Britain. Avian Paramyxovirus of serotype 1 has been identified as the main perpetrator and the virus has been characterised as being a distinct group (PPMV-1) within the PMV-1 serotype. Meanwhile the disease has been spread all over Europe and even all over the world. The clinical signs which were seen are fairly consistent for all the affected birds consisting initially of profuse watery diarrhoea, frequently green in colour. Sometimes no further disease signs were seen but more usually nervous signs consisting of torticollis, drooping wings, leg paralysis, difficulties in alighting, tremor, incoordination, circling in flight, flying backwards and inability to pick grain from the floor were seen in various combinations and degrees of severity. It is difficult to estimate the overall mortality and morbidity in affected lofts. In the majority of cases less than 20 per cent of the birds were affected at the time of notification but the recorded morbidity varied between 20 and 80 per cent. In general the mortality was low but the culling of sick birds made this difficult to estimate.

10.2.e.eng

FOWL POX VIRUS

Pox is a common viral disease of domestic birds (e.g. chickens, turkeys, pigeons and canaries). It is a slow-spreading disease characterized by the development of discrete, nodular proliferative skin lesions on the unfeathered parts of the body or fibrinonecrotic and proliferative lesions in the mucous membrane of the upper respiratory tract, mouth and oesophagus. Poxvirus infection occurs through mechanical transmission of the virus to the injured or lacerated skin. Insects mechanically carrying the virus may deposit it in the eye. In a contaminated environment the aerosol generated by feathers and dried scabs containing poxvirus particles provide suitable conditions for cutaneous and respiratory infection. Mortality in chickens is usually low but in severe cases it may be as high as 50%. Morbidity rate of pox in chickens varies from a few birds being infected to involvement of the entire flock if a virulent virus is present and no control measures are taken.

10.2.e.eng

AVIAN ENCEPHALOMYELITIS VIRUS

Avian encephalomyelitis (AE) is a viral disease of young chickens caused by a virus from the Hepatovirus family and characterised by central nervous system signs (Epidemic Tremors). It can be the cause of significant economic loss. Chickens of all ages are susceptible, but clinical signs of encephalitis only develop in those younger than three weeks. In older birds a drop in egg production is most commonly observed. The disease is similar in turkeys and chickens. Under field conditions disease is most common in the 1-2 week age group. If the disease is present in older birds the most common symptom is a drop in egg production. AE virus is transmitted both vertically and horizontally i.e. through the egg and by contact. Eggs laid by hens with sub-clinical infection will carry the virus. While hatchability drops, eggs will hatch and chicks will develop clinical disease soon after. Affected chicks shed virus in faeces and will infect susceptible in-contact chicks.

10.2.e.eng

Bacterial pathogens

INFECTIOUS CORYZA

Infectious coryza is an acute respiratory disease of chickens caused by *Haemophilus paragallinarum*. It may occur worldwide in growing chickens and layers and causes economical losses due to an increased number of culls and a marked (10% to more than 40%) drop in egg production, particularly on multi-age farms. The most common clinical signs are nasal discharge, facial swelling, lacrimation, anorexia and diarrhoea. Decreased feed intake and water consumption retards growth in young stock and reduces egg

production in laying flocks. In the uncomplicated infection, mortality is low. But infectious coryza can be complicated by other pathogens and stress factors. Unique clinical presentations such as arthritis and septicemia, presumably complicated by the presence of other pathogens, such as *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp., avian rhinotracheitis virus and infectious bronchitis virus, have been found in broiler and layer flocks. Overall it can be stated that the clinical signs and economic impact of the complicated coryza infections seen in developing countries can be markedly different from those in the uncomplicated infections typically seen in developed countries.

It is well established that active acquired antibodies after vaccination play an important role in the prevention of infectious coryza in chickens. Vaccination of the birds is therefore generally considered to be the optimal strategy to prevent these problems.

From the early days of *H. paragallinarum* bacterin (inactivated whole cell vaccine) production, it was obvious that protection was immunotype specific and that cross-protection was limited against the Page serotypes in the vaccine. Furthermore, Yamaguchi et al. found only partial cross-protection within various strains of serotype B. Outbreaks of infectious coryza were reported in different countries despite routine vaccination with currently available commercial vaccines, including the trivalent vaccines. These outbreaks indicate a new serotype of *H. paragallinarum*: variant type B. This implies that an inactivated vaccine must include at least all three Page serotypes preferably supplemented with the emerging new immunotype to provide protection against infectious coryza.

10.2.e.eng

E. COLI

A number of diseases in poultry are attributed to *E. coli* infections (colibacillosis) including omphalitis, colisepticemia, airsac disease, enteritis, arthritis, salpingitis/peritonitis, coligranuloma and panophthalmia. These diseases are responsible for major economic losses to the poultry industry. Colibacillosis is regarded as the most important bacterial infection in intensive poultry farming and above all in the broiler sector.

The pathogenesis of colibacillosis has been described and extensively reviewed in literature. Infection of eggs may lead to embryo and early chick mortality. Aerogenic infection may lead to airsac disease, a secondary infection, particularly in young birds and poults.

Airsac disease is characterized by a subacute fibrino purulent polyserositis. A severe airsacculitis is present, often accompanied by pericarditis and perihepatitis.

Colibacillosis is spread worldwide, which is illustrated by relevant literature from different countries.

Important economic losses occur as a result of mortality, but especially due to retardation of growth, bad feed conversion, diminished quality or condemnation at slaughter, and cost of medical treatment.

Colibacillosis continues to be an important disease in the broiler industry. To reduce the need of the extensive application of antibiotics the role of vaccination against colibacillosis becomes more and more important.

10.2.e.eng

ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE

Erysipelas in birds is generally an acute and fulminating infection of individuals within a flock. It is caused by the bacterium *Erysipelothrix rhusiopathiae*, which is worldwide in distribution. E

is, reptiles and amphibians, as well as surface slime of fish.

Active immunization against turkey erysipelas is mainly carried out by *E. coli* bacterin. These bacterins were initially developed for use in swine but were also shown to be effective in preventing erysipelas in turkeys. Only certain strains of *E. rhusiopathiae* are effective.

This product, *E. coli* bacterin, has been described as a *E. coli* bacterin. This immunizing *E. coli* bacterin is *E. coli* bacterin.

10.2.e.eng

and 10.1 c en 10.2 g or other suitable 10.1 c en 10.2 g
Original efficacy demonstrations in turkeys were based on intramuscular injections. Currently subcutaneous inoculations are used, to avoid local reactions in the meat.

10.2 .e. en g

MYCOPLASMA

Mycoplasmas are very small prokaryotes lacking a cell wall, confined by a plasma membrane only. They have complex nutritional requirements and as such are obligate parasitic organisms. They are found in many organisms, ranging from humans, animals, and insects to plants, but are quite host-specific. The Pathogenic avian mycoplasmas are *Mycoplasma gallisepticum*, and *M. synoviae* which infect both chickens and turkeys. *M. meleagridis* and *M. iowae* have only been found in turkeys.

Infections with *M. gallisepticum* leads to nasal discharge, coughing, sneezing, tracheal râles, sinusitis and conjunctivitis. Other consequences are poor weight gain, downgrading at slaughter (airsacculitis), reduced production in layers and reduced hatchability and livability of chicks. In some cases lameness, nervous signs, and salpingitis can be seen.

M. synoviae infection most frequently occurs in chickens as a subclinical upper respiratory infection. Depending on condition of the chicken, *M. synoviae* may cause air sac lesions. *M. synoviae* infection may become systemic and result in infectious synovitis, an acute to chronic infectious disease of chickens and turkeys, involving primarily the synovial membranes of joints and tendon sheaths producing an exudative synovitis, tenovaginitis, or bursitis.

Effective vaccination strategies can only sufficiently be provided by live attenuated vaccines. For inactivated vaccines larger amounts of antigenic material is required to induce an effective immune response, making inactivated vaccines more expensive and labour intensive. The parenteral route of administration is not optimal for vaccinating large numbers of chickens. Live attenuated vaccines more closely mimic natural infection, fuelling a highly adaptive immune response by the vaccine. As a consequence less antigenic material is required. Furthermore, administration can also be performed by spray-vaccination.

10.2 .e. en g

10.2 .e. en g

SALMONELLA

Different Salmonella serovars exist. Infection of poultry with salmonella has also important public health significance, particularly infection with the invasive strains. *S. enteritidis* and *S. typhimurium* have emerged as the most frequent infections of poultry and have been associated with many cases of human food poisoning. The poultry industry has made great efforts to control these salmonellae, by vaccination, by the use of bacteriological testing and removal of infected birds, by improved hygiene and careful selection of breeding stock.

Salmonella gallinarum is recognised as the causative agent of fowl typhoid (FT), which is a typical poultry disease and which appears to be distributed world-wide. S.g. has a high host specificity for chickens and to a lesser extent for turkeys. Birds which are clinically ill are lethargic and anorexic with pale wattles and comb and produce a green, foul diarrhoea. Bacteria enter mainly by the oral route and once in the gut they invade and are taken to macrophages in the spleen and elsewhere where they multiply resulting in disease. They re-enter the alimentary tract during the later stages of clinical disease from where they are shed. Drops in egg production only occurs substantially in the very late stages of disease. Acute outbreaks cause severe economic losses due to mortality, production losses and costs of medication and sanitation.

S. Pullorum produces pullorum disease, a disease which is clinically very similar to human typhoid but with severe disease only in very young birds. As with *S. Gallinarum* transmission is faecal-oral in very young birds, occurring frequently in the hatchery where vertical transmission also occurs. Mortality varies also according to bacterial strain and host genetic background.

Food poisoning serovars are *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Montevideo*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar* and many others. The main concern, is the potential threat they pose to human health. *S.e.* contamination is one of the major causes of food poisoning.

10.2 .e. en g

10.2 .e. en g

Parasitic pathogens

COCCIDIOSIS

Coccidiosis is caused by protozoa of the phylum Apicomplexa, family Eimeriidae. In poultry, most species belong to the genus *Eimeria* and infect various sites in the intestine. The most common species are *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* and *E. tenella*.

The infectious process is rapid (4–7 days) and is characterized by parasite replication in host cells with extensive damage to the intestinal mucosa. Poultry coccidia are generally host-specific, and the different species parasitize specific parts of the intestine.

10.2.e.eng [REDACTED] nes and compatibility studies with other vaccines are part of the ongoing development activities.

Minor pathogens and new diseases

Fungal contamination of feed material results in the exposure of chickens to 10.1.c.en.10.2.g [REDACTED] that can have direct negative effects on the chicken's health or 10.1.c.en.10.2.g [REDACTED] interfere with an effective response to vaccination against other diseases. 10.1.c.en.10.2.g [REDACTED]

R&D projects and historical progress

Work carried out during the last five years has been successful in bringing a number of new products to the market 10.1.c.en.10.2.g [REDACTED]

In addition, studies were undertaken to show compatibility of existing and new products to be able to give sound advice on the vaccination schedules to be used in the field and to obtain label claims for associated use, i.e. mixing or application of two or more vaccines at the same time.

Whereas one could argue that no further work is needed once a vaccine against a certain pathogen has been developed, in reality the optimization of 10.2.e.eng [REDACTED] vaccine range is a continuous process. The 10.2.e.eng [REDACTED] aims to improve its products to become 10.2.e.eng [REDACTED]

10.2.e.eng [REDACTED] For instance, 10.2.e.eng [REDACTED] that have to be given to chickens and are therefore adventitious from an animal welfare as well as from a farm management perspective. Development of 10.2.e.eng [REDACTED]

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?

The first goal of the project is to generate the efficacy and safety data to be included in marketing authorization applications (registration dossiers) for new chicken vaccines. The new vaccines will already have shown proof of concept (i.e. induction of protection combined with an acceptable safety profile) in the research phase, and the studies to be undertaken in this project are needed to fulfil the regulatory requirement in- and outside the EU.

The second goal is to generate additional data for existing vaccines; this can be new claims for the vaccine 10.1.c.en.10.2.g [REDACTED]

[REDACTED] or safety and efficacy data needed to support changes in the production process.

Important information is also generated for the end user; this can be information on vaccination schedules used in the field, and information on protocols to evaluate vaccine take.

The outcome of the project is the licensing of new vaccines that fulfil unmet needs in the field of the

chicken livestock industry, a successful variation application for existing vaccines to update the product profile or production process, or the generation of important information for the end user of the vaccine.

3.3 Relevance

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

Vaccines are the most effective method for prevention or eradication of diseases. Further improvement and extension of the available vaccine ranges will bring safer, more efficacious vaccines, including vaccines against emerging diseases. Also, combinations of diseases can be encountered more effectively and with fewer vaccinations when vaccines are developed that protect against multiple diseases, contain multiple components or can be used at the same time or mixed with other vaccines.

The prospects are that the new vaccines will further reduce animal suffering and the use of antibiotics, and will lead to reduced losses in meat and egg production and thereby to a more economical use of natural resources.

3.4 Research strategy

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

At the start of the development phase of a new vaccine, it is decided in which area(s) of the world the product is intended to be licensed as that determines which types of studies have to be performed to satisfy regulatory requirements. In general, the types of studies are similar in all countries, but specific requirements may exist with regard to the numbers of animals to be used, efficacy criteria to be evaluated or the set-up of studies (e.g. inclusion of a double-dose group in safety studies with inactivated vaccines for a number of countries outside the EU). At that time, also the minimum vaccination age, the vaccination schedule and the intended label claims are set. Registration dossiers need to contain a comprehensive set of efficacy and safety studies in the target animal to allow regulatory bodies to make a sound risk-benefit analysis that is the basis for their decision on the marketing approval of a new product. During the evaluation of the registration dossier, additional animal studies may be requested by the regulatory authorities.

Similarly, when updating the characteristics of a licensed vaccine, e.g. when there is a significant change in the production process, adding another administration route, showing compatibility with another product 10.1 c en 10.2 g, the number of studies required depends on the regulations and guidelines for registration variation procedures.

For the post licensing studies aimed at generating key information for the end user, key research questions will be evaluated, and studies will be designed in a way to generate the needed information with the minimum number of studies.

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.

During the development phase, the following types of animal experiments will be undertaken (described in detail in appendices 1 through 4).

1. The safety of a new vaccine will be evaluated in chickens according to Ph.Eur. 5.2.6 (Evaluation of safety of veterinary vaccines and immunosera) or vaccine-specific monographs, EU Directive 2001/82/EC, including amendments (Community code relating to veterinary medicinal products) and national guidelines and regulations outside the EU. This generally means observation for abnormal systemic (clinical signs etc.) and local (injection site) reactions after administration. For vaccines that are intended to be given to laying birds, also the effect on reproductive performance may be investigated. Immunological functions need to be examined where the product might be expected to adversely affect the immune response of the vaccinated animal. In addition to these parameters, live vaccines will have to be evaluated for persistence and dissemination in vaccinated animals and their ability to spread. Live vaccines will also be tested for reversion to virulence, i.e. re-isolation of the vaccine from vaccinated animals followed by administration back into other animals up to five times in total. In case there is a risk of recombination or genomic re-assortment of the vaccine strain, this could also require additional studies.

Most studies will be performed according to the following basic set-up:

- Administration of the vaccine
- Observation of systemic and local reactions post vaccination
- Monitoring of persistence and excretion of the vaccine by sampling of blood, excretions and mucosal swabs (live vaccine only)

- Necropsy to investigate (histo)pathological changes at the injection site and re-isolation of the vaccine (live vaccine only)

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care.

2. For live vaccines that are derived from a pathogen with a broad host range and/or zoonotic potential, it is necessary to investigate the safety for non-target species that may come into contact with the vaccine according to Ph.Eur 5.2.6 (Evaluation of safety of veterinary vaccines and immunosera), EU Directive 2001/82/EC, including amendments (Community code relating to veterinary medicinal products) and national guidelines and regulations outside the EU. This means observation for clinical signs after administration, persistence and shedding.

Studies will be performed according to the following basic set-up:

- Administration of the vaccine
- Observation of systemic and local reactions post vaccination
- Monitoring of persistence and excretion of the vaccine by sampling of blood, excretions and mucosal swabs
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes and re-isolation of the vaccine

Discomfort will be mild. As the vaccines to be tested have already been found to be safe in the target species (chickens) it is very unlikely that they will cause disease in non-target animals.

3. During development or life cycle management, the efficacy of vaccines (of the final product/formulation) should be shown under controlled laboratory conditions as described in Ph.Eur 5.2.7 (Evaluation of efficacy of veterinary vaccines and immunosera) or vaccine specific monographs, EU Directive 2001/82/EC, including amendments (Community code relating to veterinary medicinal products) and national guidelines and regulations outside the EU. For all efficacy claims (e.g. protection against infection, reduction of clinical signs, reduction of shedding, reduction of weight loss) to be made for a new or updated product, proof should be provided by showing a meaningful and statistical significant difference between vaccinated animals and unvaccinated controls in an infection model (vaccination-challenge studies). Also, claims regarding onset and duration of immunity have to be substantiated by vaccination-challenge studies. Infection models may be described in vaccine-specific Ph.Eur monographs or may have been developed during the research phase of vaccine development. In those instances where a surrogate (e.g. serological) marker for protection has been established, (part of) the vaccination-challenge studies may be replaced by studies that only measure the immunological response after vaccination. The same principle applies to studies performed to generate key information for the end user.

Studies will be performed according to the following basic set-up (infection will not be performed if an immunological marker for protection is available):

- Administration of the vaccine
- Monitoring responses / vaccine take (e.g. blood sampling, feather pulp, tissues, etc.)
- Infection with a pathogen
- Observation of clinical signs post infection/sampling (e.g. for shedding of the pathogen)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care. A mild to severe degree of suffering may occur after the onset of clinical disease following infection, but at a lower level in the vaccinated animals than in the unvaccinated controls.

4. The quality of inactivated vaccine batches is often measured in an *in vivo* potency test: chickens are in that case injected with vaccine and the antibody response against the vaccine is subsequently measured in the serum of the vaccinated chickens. All vaccine batches used in the development or life cycle management studies have to be tested to set the limits for release (during development) or confirm the vaccine meets the set release requirement (during life cycle management). Furthermore, the potency of the vaccine has to be confirmed at pre-set intervals for at least 3 batches that are included in a stability monitoring program.

Studies will be performed according to the following basic set-up:

- Administration of the vaccine
- Monitoring responses/vaccine take (blood sampling, feather pulp, tissues, etc)

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is only mild and such procedures are routinely used in normal veterinary care.

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.

At the 10.2.e.eng, all R&D projects are subject to regular review by 10.2.e.eng. If the 10.2.e.eng markets already a vaccine against the specific disease, an evaluation will be made, whether that vaccine can be updated, which in most cases is the preferred situation because less (animal) studies are required, or a new vaccine candidate needs to be further developed. Only vaccine candidates for which the safety and efficacy data obtained during the research phase indicate a high probability of success, are approved for further development.

At the start of a development project, the project team agrees on the types of studies required and the sequence of these studies (the basic safety and efficacy studies are started first, to demonstrate the vaccine can meet regulatory requirements).

Typically, the vaccine dose, route and schedule are first determined in an efficacy study in naïve animals, free of antibodies against the respective antigen. In this basic efficacy studies, the challenge infection is mostly done 3-4 weeks after the vaccination. If a vaccine is intended for use in young animals, the dose is then confirmed in animals with maternal antibodies. In a later stage of the project, the efficacy is tested for a longer interval between vaccination and challenge to demonstrate the duration of immunity. It may also be required to perform studies with a shorter interval between vaccination and challenge to determine the onset of immunity.

The safety of the vaccine is investigated in parallel, but in separate studies, as the dose levels to be tested are different from the levels in the efficacy studies. In case of a live vaccine, the following safety characteristics have to be investigated: i) dissemination of the strain in the vaccinated animal, ii) shedding of the strain, iii) the potential to spread to in-contact animals and iv) the potential to revert to virulence by animal-to-animal passage v) effect on immunological function, vi) possibility for recombination.

Once these criteria are met, the safety of the final product composition (including any excipients such as freeze-dry stabilizers and adjuvant) has to be demonstrated in animals of the most susceptible categories: animals of the youngest age group intended for vaccination. If a vaccine should be used during egg lay, the safety has also to be demonstrated in laying birds.

All above mentioned studies done to obtain regulatory approval for poultry vaccines are mandatory.

During regular (10.1.c.en 10.2.g project reviews by the 10.2.e.eng the outcome of studies is assessed against the requirements and pre-set milestones as well as go/no-go decision points are evaluated. Typical go/no go decision points for are results of safety studies (vaccine needs to be safe and comply with regulatory requirements) and efficacy studies (vaccine needs to be efficacious and comply with regulatory requirements). When the project involves a change in the production process a typical go/no go point could be whether safety and efficacy have not been negatively affected by the proposed change. Other go/no go decisions will depend on the anticipated product profile.

After vaccine registration has been obtained, the vaccine enters the lifecycle management phase. During this phase R&D post-licensing studies might be initiated for the addition of new claims or to provide valuable information for the end user. Studies to add new claims to the product registration will need to comply to regulatory requirements and go/no go in those projects are similar to the go/no go as described above.

Studies to obtain key information for the end user are initiated based on requests coming from the field. Often the research questions can be answered with one or two studies. In cases where more studies would be needed, a research plan will be set up with pre-set milestones as well as go/no-go decision points similar as outline above.

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	Development: Safety studies in chickens

2	Development: Safety studies in non-target animals
3	Development: Efficacy studies in chickens
4	Development: In vivo potency testing in chickens
5	
6	
7	
8	
9	
10	

DEC-advies

In blauw antwoorden en toevoegingen behorend bij deze wijziging.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD^{10.2 .e. en g}20173706-5
2. Titel van het project: **Development of new poultry vaccines**
3. Titel van de NTS: **Ontwikkeling en registratie van nieuwe vaccins tegen ziekten bij kippen**
4. Type aanvraag: wijziging
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: ^{10.2 .e. en g}
 - telefoonnummer contactpersoon: ^{10.2 .e. en g}
 - e-mailadres contactpersoon: ^{10.2 .e. en g}
 -
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 08-10-2020
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken
 - anderszins behandeld: schriftelijk behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD: 23-10-2020
7. De wijziging is afgestemd met de IvD en deze heeft de instemming van de IvD.
Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t. voor de gevraagde wijziging
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager: n.v.t. voor de wijziging
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) er is geen advies gevraagd aan experts, die geen lid zijn van de DEC: n.v.t. voor de wijziging

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Ja
2. De aanvraag betreft een wijziging.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? Ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Er zijn geen DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.

• Beoordeling (inhoud)

5. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*). Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling: "Development of new poultry vaccines". Het project heeft betrekking op dierstudies met de uiteindelijke formulering van nieuwe of verbeterde vaccins voor pluimvee, die worden verricht om het registratiedossier op te bouwen dat nodig is om die vaccins aan te kunnen bieden aan de registratie-autoriteiten in de verschillende afzetgebieden. Voor alle experimenten in dit project geldt dat de wijze van uitvoering ofwel is vastgelegd in richtlijnen die zijn uitgevaardigd door de registratie-autoriteiten (bijvoorbeeld de EP), ofwel in overleg met die autoriteiten wordt bepaald. De fase waarin deze experimenten worden verricht staat bekend als de "development fase". Dit project heeft géén betrekking op experimenten die worden verricht in de daaraan voorafgaande "research fase".

Het betreft experimenten die data opleveren over de "efficacy", veiligheid (voor de doeldieren en voor zogenaamde "non-target animals") en "potency" van de vaccins. De beschreven dierproeven zijn duidelijk wat betreft de uit te voeren handelingen en daarmee gepaard gaande ongerief voor het individuele dier. De eenvormigheid qua design en het routinematige karakter van de beschreven safety en "efficacy" studies, ongeacht de ziekteverwekker die het betreft, is volgens de DEC één van de redenen waarom dit project als een toetsbare eenheid kan worden beschouwd. In de overgrote meerderheid van de gevallen zijn het de experimentele procedures, en niet zozeer de aard van de ziekteverwekker of het antigeen, die de mate van welzijnsaantasting van de proefdieren bepalen (zie C11).

De hoofdreden voor deze wijziging is een aanpassing in de R&D-structuur binnen 10.2 .e. en g

[redacted] deze sluiting was ten tijde van de oorspronkelijke indiening van de projectaanvraag niet bekend. In 10.2 .e. en g is de transfer afgerond en de afdeling in 10.2 .e. en g gesloten. Hierdoor is het onderzoeksteam in 10.2 .e. en g gegroeid en zijn de projecten van de afdeling van 10.2 .e. en g voornamelijk 10.2 .e. en g, voortgezet in 10.2 .e. en g. Op basis van het diergebruik tot dusver en te verwachten/gepland onderzoek voor de verdere looptijd van de vergunning, is de vergunning aangepast aan de nieuwe situatie en verfijnd op basis van de huidige inzichten. De aantallen dieren die onder de vier appendices vallen zijn zorgvuldig bekeken en omvatten een verhoging van aantallen dieren op twee onderdelen als gevolg van de overgeplaatste onderzoeksactiviteiten. Dit zijn "efficacy studies in chickens" voor 10.2 .e. en g pathogenen onder appendix 3 en "in vivo potency testing of poultry vaccine batches" onder appendix 4. De toename in appendix 3 gaat gepaard met een verlaging van de procentuele aantallen in de hogere ongeriefklassen. Verder worden een aantal kippen toegevoegd aan appendix 2 "safety studies in non target animals". De beoogde

aanpassingen in dit wijzigingsvoorstel omvatten een verhoging van 25810 naar 36050 kippen.

In de bewoordingen van de aanvrager (brief):

Studies voor *Life cycle management* zijn onderdeel van de vergunning. Deze studies worden uitgevoerd na de productregistratie. Onder deze studies vallen studies voor updates in het productieproces van het vaccin die een impact kunnen hebben op de veiligheid/effectiviteit en updates voor de indicaties (claims) voor het product (bijvoorbeeld een nieuwe toedieningsroutes of een compatibiliteit met andere vaccins). Verder vallen er studies onder die belangrijke informatie voor de gebruiker geven. Dit omvat onder andere studies die de bescherming evalueren 10.1 c en 10.2 g n van de ziekte en studies die naar effectiviteit kijken van huidige vaccinatie protocollen welke in de pluimveesector worden toegepast.

In de voorgestelde wijziging is nu meer detail toegevoegd voor dit soort studies, omdat sommige studies die we wensen uit te voeren nu niet voldoende gespecificeerd zijn. Het gaat dan om studies die kijken naar het nemen van samples na vaccinatie zodat geverifieerd kan worden dat de kippen correct gevaccineerd zijn. 10.1 c en 10.2 g

en vervangen de levende vaccinaties voor deze ziekten. Het is daarom heel belangrijk voor de eindgebruiker (dierenartsen en pluimveebedrijven) om te controleren dat vaccinatie goed is gedaan; als vaccin leverancier moeten we onze klant hier goed over informeren. Deze studies helpen ons ook te controleren of vaccins in het veld op een juiste manier worden opgeslagen, voorbereid en gebruikt. Verder is het voor het bedrijf en ook voor de eindgebruiker van grote waarde om inzicht te krijgen in de werkzaamheid en mate van de bescherming van onze nieuwe geregistreerde (10.1 c en 10.2 g) vaccins in vergelijking met vaccins van concurrenten. Derhalve worden ook studies uitgevoerd om verschillende vaccins met elkaar te vergelijken. De DEC heeft dit als fase 4 trials geïnterpreteerd. Met de gegevens uit deze studies kan het bedrijf gefundeerd advies geven aan haar klanten in het veld, om op deze wijze te helpen om ziekte-uitbraken in het veld te voorkomen of te verminderen.

6. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet). *Voor zover bekend bij de DEC zijn er geen aspecten in de aanvraag die niet in overeenstemming zijn met andere wet- en regelgeving.*

Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.

7. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. *De DEC is van mening dat de genoemde doelcategorieën "translationeel" en "wettelijk verplicht" aansluiten bij de hoofddoelstelling.* Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.

Belangen en waarden

8. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*). *Het directe doel van het project is het verzamelen van data met betrekking tot nieuwe of verbeterde vaccins voor pluimvee, waarmee een dossier kan worden opgebouwd dat de aanvrager nodig heeft om die vaccins te kunnen registreren en op de markt te kunnen brengen. Het uiteindelijke doel is het reduceren of voorkomen van infecties bij pluimvee door nieuwe of verbeterde vaccins op de markt te brengen. Er is een reële relatie tussen*

het directe doel en het uiteindelijke doel. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag

- 9.** Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*) *De belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn de proefdieren, de aanvrager en de doeldieren (pluimvee) en hun eigenaren en de samenleving en de burgers. De proefdieren in het project zullen verschillende niveaus van ongerief ondergaan, waardoor hun welzijn wordt aangetast. De uiteindelijke doeldieren (pluimvee) zal veel stress en ongerief bespaard blijven, omdat de vaccins hen bescherming tegen infecties zullen bieden. De aanvrager heeft een aanzienlijk economisch belang bij het op de markt kunnen brengen van vaccins voor pluimvee. Ook de pluimveehouders die hun dieren laten vaccineren hebben een aanzienlijk economisch belang, maar zeker ook een belang vanuit hun zorg voor de dieren, bij het beschikbaar komen van goede en goedkope (combinatie)vaccins die tijdens zo min mogelijk vaccinatiemomenten kunnen worden toegediend. De samenleving en de burgers hebben een direct belang bij het terugdringen van het gebruik van antibiotica in de pluimveehouderij, iets waar vaccins aan bijdragen. Ook werken uitbraken van dierziekten ontwrichtend op de samenleving en veroorzaken ze grote economische schade. Een aantal van de vaccins beschermt de dieren tegen zoönoses, zoals Salmonella, die ook voor de mens of andere dieren een bedreiging vormen. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.*
- 10.** Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen. *Er is geen sprake van substantiële milieueffecten. Bij het onderzoek met ziekteverwekkende micro-organismen wordt gewerkt in overeenstemming met de geldende wet- en regelgeving voor inperking van deze organismen. Dieren die gevaccineerd zijn met niet geregistreerde vaccins of die gechallenged zijn met ziekteverwekkers worden gedood om te voorkomen dat producten van die dieren (zoals vlees en eieren) in het milieu of in de voedselketen terecht komen. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.*

Proefopzet en haalbaarheid

- 11.** Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*). *De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en infrastructuur beschikt om de doelstelling van het onderzoek binnen de gevraagde termijn te realiseren. Dit wordt ondersteund door het feit dat de aanvrager al eerder succesvol vaccins voor pluimvee heeft ontwikkeld en op de markt gebracht. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.*
- 12.** Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). *De DEC is van mening dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project. Het onderzoek wordt voor het grootste deel uitgevoerd in het doeldier, met uitzondering van de dierproeven in bijlage 2, waar in andere diersoorten de veiligheid voor die soorten onderzocht zal worden, en een deel van de "potency" testen in bijlage 4. Het behalen van de directe doelstellingen is vooral afhankelijk van het zo strikt mogelijk volgens de richtlijnen en afspraken uitvoeren van de experimenten. De aanvrager heeft daar zeer veel ervaring mee. Alleen vaccins waarvan in de "researchfase" is gebleken dat ze naar alle waarschijnlijkheid aan de eisen zullen voldoen, worden in de "development fase"*

getest. De kans is daardoor relatief klein dat de experimenten toch nog uitwijzen dat de vaccins niet veilig of niet voldoende werkzaam zijn, al komt dit zeker wel eens voor. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.

Welzijn dieren

13. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) **deels aankoop van (commerciële) leverancier.**
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

Er is sprake van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Voor onderzoek naar werkzaamheid en veiligheid van diergeneesmiddelen, waaronder de vaccins vallen, is onderzoek in het uiteindelijke doeldier, en in diersoorten die in de praktijk in aanraking zouden kunnen komen met de gevaccineerde dieren, wettelijk verplicht. Het is niet ongebruikelijk daarvoor dieren aan te kopen die niet speciaal voor dierproeven zijn gefokt. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.

14. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. *De te gebruiken dieren worden in principe gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen gesteld in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU. In een aantal gevallen is huisvesting in isolatoren noodzakelijk om overdracht van ziekteverwekkers op andere dieren te voorkomen. In dat geval geldt volgens de aanvrager het volgende: "In case animals need to be housed in isolators the exemption given in the directive 2010/63/EU, annex III, in the section on domestic fowl is applicable and "birds can be housed in smaller enclosures containing appropriate enrichment with a minimum floor area of 0,75 m²". Dit komt overeen met wat in dit type onderzoek gebruikelijk is en is voldoende onderbouwd. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.*

15. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

Het ongerief van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor het grootste deel van de dieren in de veiligheidsstudies (bijlage 1 en 2) en in de werkzaamheidsstudies waarin gechallenged wordt met ziekteverwekkers die licht of

matig ongerief veroorzaken (bijlage 3), geldt dat het ongerief vooral bepaald wordt door de bekende routinematige procedures die deel uitmaken van deze experimenten: toediening van het vaccin, monsternames, toediening van de ziekteverwekker en observatie van symptomen. In een kleiner deel van de gevallen is het nodig om de dieren in het kader van werkzaamheidsstudies te challengen met ziekteverwekkers die ernstige ziekteverschijnselen kunnen veroorzaken (bijlage 3). Daarbij dient te worden aangetekend dat veel van de dieren die met deze ziekteverwekkers worden gechallenged beschermd zullen zijn door het te testen vaccin. Een ernstige aantasting van het welzijn kan zich voordoen in onbeschermd controlerieren of dieren die door een lage dosis van het vaccin niet volledig beschermd zijn. Ook in sommige veiligheidsstudies kunnen challenges zijn opgenomen in de richtlijnen voor uitvoering. Die kunnen eveneens ernstig ongerief veroorzaken (totaal maximaal 17% van het totaal aantal dieren in de aanvraag). De aard van deze verschijnselen is voor alle gangbare ziekteverwekkers bekend en in de loop van vele jaren zijn bij ^{102.e. en g} in nauwe samenspraak tussen onderzoekers, proefdierdeskundigen/IvD en de DEC strikte criteria voor humane eindpunten ontwikkeld. Voor alle dieren in de projectaanvraag geldt dat navolgbaar is in welk soort experiment zij zullen worden ingezet, welke handelingen ze zullen ondergaan en welke gevolgen dat heeft voor hun welzijn. In aanvulling hierop: de mate van ongerief is voor een deel van de kippen minder ernstig geworden en gaat naar matig.

- 16.** Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).
Elke dierproef vormt, door de vrijheidsbeperking en de aantasting van de lichamelijke integriteit voor instrumentele doeleinden, een aantasting van de integriteit van het dier. Het toedienen van vaccins, het afnemen van bloed en het toedienen van ziekteverwekkers en de gevolgen daarvan, kunnen natuurlijk beschouwd worden als een aantasting van de integriteit van de dieren, maar de DEC is van oordeel dat bij deze handelingen het ongerief (de welzijnsaantasting) op de voorgrond staat. De aantasting van de integriteit van de dieren is daarmee vergeleken beperkt. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.
- 17.** Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).
De aard van de ziekteverschijnselen is voor alle gangbare ziekteverwekkers bekend en in de loop van vele jaren zijn bij aanvrager in nauwe samenspraak tussen onderzoekers, proefdierdeskundigen/IvD en de DEC strikte criteria voor humane eindpunten ontwikkeld. Voor elk werkprotocol worden de humane eindpunten en de eindverantwoordelijkheid voor het toepassen daarvan, tot in detail afgestemd met de IvD. Bij onduidelijkheid of verschil van inzicht over de criteria in concrete situaties geeft het oordeel van de op dat moment verantwoordelijke dierenarts de doorslag. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.

3V's

- 18.** Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).
Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Het pluimvee, meestal kippen, is in veel van de experimenten zowel proefdier als doeldier. Bovendien hebben de voorgestelde veiligheids- en werkzaamheidsstudies een sterk routinematig karakter en is het design van de experimenten in veel gevallen tot in detail door de autoriteiten voorgeschreven of met de autoriteiten afgesproken. Voor de huidige doelstelling, registratie van de vaccins, is er geen geaccepteerd

vervangingsalternatief voor deze experimenten. Daar waar mogelijk wordt al gebruik gemaakt van in vitro experimenten. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.

- 19.** Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). *Voor wettelijk vereiste experimenten liggen de aantallen te gebruiken dieren vaak vast. Wanneer dit niet het geval is, zal het aantal benodigde dieren in de experimenten op basis van een statistische berekening worden bepaald en daarna worden afgestemd met de registratie autoriteiten. De aanvrager heeft op basis van recente ervaring met dit soort experimenten een realistische inschatting gemaakt van het totaal aantal te gebruiken dieren. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.*
- 20.** Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). *De aard van de verwachte ziektesymptomen is voor het merendeel van de ziekteverwekkers bekend en zijn er strikte criteria voor humane eindpunten ontwikkeld. Als immunologische correlaten van protectie bekend zijn, dan wordt er naar gestreefd om geen challenge experimenten uit te voeren. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.*
- 21.** Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. *Het betreft unieke door [redacted] te ontwikkelen vaccins. [redacted] zal in alle fasen van het onderzoek de proeven zo ontwerpen dat ze voldoen aan wettelijke eisen voor markttoelating. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.*

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

- 22.** Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*). *Binnen dit project zullen in principe dieren van beide geslachten in de experimenten gebruikt worden. In gevallen waarin de dieren binnen de looptijd van de proef ouder worden dan 12 weken zal alleen gebruik gemaakt worden van hennen om te voorkomen dat de hanen individueel gehuisvest moeten worden. Solitaire huisvesting is om dierenwelzijnsredenen ongewenst en kan ook de resultaten van de experimenten beïnvloeden. Daar waar het in het kader van de experimenten nodig is om eieren of nageslacht te produceren, zal het geslacht van de dieren dienovereenkomstig worden gekozen. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.*
- 23.** Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Veel dieren zullen aan het eind van de studies gedood worden, omdat post mortem onderzoek noodzakelijk is om goed te kunnen beoordelen in welke mate vaccins bescherming bieden en om uit te sluiten dat vaccins schade veroorzaakt hebben. Overige dieren die niet kunnen worden hergebruikt zullen aan het eind van de studie gedood worden. Ook kunnen dieren die met ziekteverwekkers of niet geregistreerde vaccins behandeld zijn, mogelijk een gevaar vormen voor hun omgeving of het milieu. Daarom moeten zij op verantwoorde wijze worden gedood en afgevoerd. De aanvrager gebruikt methoden die beschreven zijn in bijlage IV van de richtlijn 2010/63/EU. Niet gewijzigd t.o.v. de vorige aanvraag.

- 24.** Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. N.v.t.

NTS

- 25.** Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en is duidelijk geformuleerd.

C. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*). *Rechtvaardigt het belang van het testen van de veiligheid en werkzaamheid van vaccins voor pluimvee het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?*
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).
Voor het merendeel van de dieren (83%) die gebruikt worden in de voorgestelde experimenten, leiden de experimenten tot licht of matig ongerief en een beperkte aantasting van hun integriteit. Met name als de werkzaamheid van de vaccins wordt getest kan dit voor een deel van de dieren (17% van het totaal) leiden tot ernstig ongerief, omdat in de challengeproeven niet gevaccineerde controlegroepen worden gebruikt. De onderzoekers doen deze challengeproeven slechts als er geen geaccepteerd alternatief voorhanden is. De duur en de ernst van het ongerief worden door de onderzoekers zoveel mogelijk beperkt.
Daar staat tegenover dat het op de markt brengen van nieuwe of verbeterde vaccins tegen infectieziekten zal bijdragen aan het verminderen van de kans op het uitbreken van infectieziekten in de pluimveepopulatie. Dit voorkomt lijden bij grote aantallen dieren.
De aanvrager heeft een groot economisch belang bij het op de markt kunnen brengen van de te testen vaccins en kan dit alleen door te voldoen aan de wettelijke eisen met betrekking tot het aantonen van de werkzaamheid en veiligheid van de vaccins. Dit kan momenteel alleen door middel van de voorgestelde dierproeven. De houders en eigenaren van de dieren hebben eveneens een groot economisch belang bij het beschikbaar komen van goede, makkelijk toepasbare en zo goedkoop mogelijke vaccins. Bij een ziekte-uitbraak op hun bedrijf leiden ze grote

economische schade. Als zij hun dieren kunnen beschermen, verbetert dat hun concurrentiepositie.

Ziekte-uitbraken bij pluimvee kunnen in een samenleving waarin het houden van pluimvee voor de productie van vlees en eieren een grootschalige economische activiteit is, tot ernstige ontwrichting van die samenleving leiden en voor grote economische schade zorgen, ook buiten de pluimveehouderij. Het kunnen beschikken over goede vaccins is een substantieel maatschappelijk belang. De aanvrager draagt daaraan bij. Tot slot dragen vaccins bij aan een beperking van het gebruik van antibiotica in de pluimveehouderij en, voor zover de vaccins bescherming bieden tegen zoönoses, beschermen ze ook mensen tegen zoönotische ziekten. Het medisch- en maatschappelijk belang daarvan is groot.

De DEC acht de economische belangen van de aanvrager en van de dierhouders op zich legitiem en zij leggen zeker enig gewicht in de schaal, maar alleen in combinatie met het grote maatschappelijke belang en de voordelen voor de doeldieren, namelijk betere vaccins en minder vaccinatiemomenten, rechtvaardigen ze het gebruik van de dieren in de experimenten.

De beoogde aanpassingen in dit wijzigingsvoorstel omvatten een verhoging met 10.240 kippen (25.810 naar 36.050). De DEC heeft haar afweging gemaakt op deze toename. De doelstelling is niet gewijzigd. Eerder werd een deel van het onderzoek in ^{10.2 .e. en g} uitgevoerd. Dat was de toenmalige commissie die de aanvraag heeft beoordeeld bekend. De aanvrager heeft in een aparte bijlage de wijziging goed toegelicht. De DEC heeft deze toelichting in haar eigen woorden opgenomen in C1. DEC heeft zich afgevraagd of het deel van het onderzoek dat overkomt uit ^{10.2 .e. en g} ^{10.2 .e. en g} was vergund, maar heeft vervolgens beseft dat dit feitelijk niet ter zake doet. ^{10.2 .e. en g} nu zelf een afweging maken over de toename in de aantallen. Deze aantallen zijn onderbouwd, er is sprake van een forse verhoging, maar ook van verfijning omdat het ongerief van een deel van de dieren in bijlage 3 lager wordt ingeschat.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, *zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld). De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen beschreven in het projectvoorstel "Development of new poultry vaccines". Volgens de DEC wegen de voordelen voor de doeldieren, de samenleving, de aanvrager en de houders van de dieren zwaarder dan de nadelen voor de gebruikte proefdieren. Het project is goed opgezet. Verder is de DEC van mening dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om te kunnen voldoen aan de 3V beginselen en dat de aanvrager ervoor zal zorgen dat het ongerief van de proefdieren zoveel mogelijk beperkt zal worden. Gelet op het bovenstaande is de DEC unaniem van oordeel dat het belang van de doelstelling van het project "Development of new poultry" het gebruik en het ongerief van de proefdieren rechtvaardigt.*

Voor het aangevraagde amendement komt de DEC niet tot een andere afweging. De belanghebbenden zijn niet veranderd en de te wegen belangen ook niet. Enkel het aantal kippen is gewijzigd en het ongerief. Dit past binnen dezelfde afweging.

Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen voor de aangevraagde wijziging; het aantal kippen te verhogen met 10.240 dieren.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- x Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
- 2.** Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*). Het advies is unaniem tot stand gekomen, ook voor de gevraagde wijziging.
- 3.** Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).
De DEC wil opmerken dat dit advies is geschreven vanuit het perspectief van een samenleving waarin de grootschalige productie van vlees en eieren, tegen een zo laag mogelijke prijs, een geaccepteerde economische activiteit is. Wereldwijd worden 50 miljard kippen gehouden. De concurrentiedruk op de wereldmarkt is groot. Wanneer die economische context als een onontkoombaar gegeven wordt beschouwd, dan weegt het belang van dit onderzoek zonder meer op tegen het ongerief van de dieren die ervoor gebruikt worden. Het is echter de unanieme mening van de DEC dat de druk om zo goedkoop mogelijk (en per dier zo veel mogelijk) te produceren leidt tot grote bedrijven met veel kippen op een kleine oppervlakte en relatief kwetsbare dieren. Een relatief kwetsbare gezondheid en niet optimale leefomstandigheden kunnen op zichzelf al bijdragen aan het ontstaan van ziekten. Bij grote concentraties dieren op een kleine oppervlakte zijn ook de economische en maatschappelijke gevolgen van uitbraken van dierziekten al snel zeer groot.
De DEC zou het betreuren als het beschikbaar komen van steeds betere vaccins tegen allerlei ziekten bij pluimvee ertoe leidt dat er niets gedaan wordt om de leefomstandigheden en de robuustheid van de dieren te verbeteren en om over te schakelen op duurzamere productiemethoden. Het beter afstemmen van de leefomstandigheden op de natuurlijke behoeften van de dieren zal weliswaar niet in alle gevallen (volledig) het uitbreken van ziekten kunnen voorkomen, en dus ook vaccins niet overbodig maken, maar het kan wel het welzijn van de dieren aanmerkelijk verbeteren. De DEC zou het toejuichen wanneer dit in striktere richtlijnen wordt vastgelegd. Bij de bespreking van deze wijziging is dit dilemma buiten de context op vergelijkbare wijze naar voren gekomen, met dezelfde conclusie.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.e.eng

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD 10.2.e.eng 20173706-5

Bijlagen

3

Datum 10 december 2020
Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e.eng

Op 6 oktober 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of new poultry vaccines" met aanvraagnummer AVD 10.2.e.eng 20173706-5. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf de datum van deze brief is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning is afgegeven voor de periode van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie [REDACTED] (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 26 oktober 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Datum:
10 december 2020
Aanvraagnummer:
AVD [REDACTED] 20173706-5

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 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 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

10 december 2020

Aanvraagnummer:

AVD-20173706-5

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



10.2.e. en g

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Development of new poultry vaccines" met aanvraagnummer AVD 10.2.e.eng 20173706-5, na advies van dierexperimentencommissie 10.2.e.eng
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.e.eng

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 6 oktober 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 23 oktober 2020;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Development: safety studies in chickens, zoals ontvangen op 23 oktober 2020;
 - 3.4.4.2 Development: Safety studies in non-target animals, zoals ontvangen op 23 oktober 2020;
 - 3.4.4.3 Development: Efficacy studies in chickens, zoals ontvangen op 23 oktober 2020;
 - 3.4.4.4 Development: In vivo potency testing of poultry vaccine batches, zoals ontvangen op 23 oktober 2020;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 23 oktober 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 26 oktober 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief	Overige opmerkingen
3.4.4.1 Development: safety studies in chickens				Onderzoeken waarvoor meer dieren nodig zijn, meer ongerief plaatsvindt of op andere wijze uitgebreider getest moet worden dan de Europese richtlijnen voorschrijven, vallen buiten deze vergunning. Voor experimenten die dit betreft kunt u een wijzigingsverzoek indienen. De 10.2.e.eng vaccine projecten vallen wel onder deze vergunning.

Aanvraagnummer:

AVD 20173706-5

	Kippen	5.000	23,0% Ernstig 77,0% Licht	
3.4.4.2 Development: Safety studies in non-target animals				Zie Bijlage Dierproeven 3.4.4.1
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	50	Licht	
	Andere vogels (andere Aves) / Kalkoenen	1.000	Licht	
	Kwartels	500	Licht	
	Andere vogels (andere Aves) / Fazanten	500	Licht	
	Andere vogels (andere Aves) / Eenden	500	Licht	
	<i>Kippen</i>	150	100,0% Licht	
3.4.4.3 Development: Efficacy studies in chickens				Zie Bijlage Dierproeven 3.4.4.1
	Kippen	17.560 / 27.150	17,8% Ernstig 19,7% Matig 62,5% Licht	
3.4.4.4 Development: In vivo potency testing of poultry vaccine batches				Zie Bijlage Dierproeven 3.4.4.1
	Kippen	3.250 / 3.750	100,0% Licht	

Voorwaarden*Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

Aanvraagnummer:

AVD  20173706-5

- 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:

AVD-20173706-5

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

Aanvraagnummer:AVD  20173706-5

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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, eerste lid onder d en derde lid 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.



Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for 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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2 .e. en g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2 .e. en g

1.3 Provide the title of the project.

Research of new poultry vaccines

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

Basic research

Translational or applied research

Regulatory use or routine production

Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare

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.

Rationale

Worldwide more than fifty billion chickens are kept for meat and egg production and approximately six billion of these live in Europe. Vaccination is perhaps the single most important measure that can be

taken to ensure these animals remain healthy by harnessing the chickens' immune system to combat infectious diseases, thus significantly reducing the amount of antibiotics and increasing animal welfare. The [10.2 .e. en g] is constantly striving to strengthen its portfolio of poultry vaccines by improving existing vaccines and developing new ones. New fields of vaccine research may include [10.1 c en 10.2 g]

[redacted] diseases. Moreover, treatments may also include [10.1 c en 10.2 g] that can be used as [10.1 c en 10.2 g] [redacted]) or as [10.1 c en 10.2 g] [redacted], improve the [10.1 c en 10.2 g] of the birds, or lead to more effective [10.1 c en 10.2 g] and hence improvement of existing vaccines.

Each pathogen has its own specific mechanism of pathogenesis and therefore protection through vaccination requires specific immune responses, either humoral, or cellular immunity, or a combination thereof. For this reason, new vaccines are to a large extent "tailor-made". Where possible, knowledge acquired with other pathogens / vaccines is used to design candidate vaccines in order to increase the likelihood of success and thereby minimize the numbers of animals needed during the whole development process of a new vaccine. Vaccines can be [10.1 c en 10.2 g]

Most inactivated vaccines are formulated together with an adjuvant and primarily induce a humoral response, while live (vector) vaccines typically induce both a humoral and cellular response. The attenuation of live vaccines can be accomplished by [10.1 c en 10.2 g] [redacted]). The development of vectored vaccines is important as it enables vaccination against [10.1 c en 10.2 g], thus [10.1 c en 10.2 g] [redacted] needed and thereby increasing animal welfare.

Most vaccines are given to animals that are facing the risk of being infected by a pathogen themselves. However, for some diseases, especially the ones that occur shortly after hatch, the chickens are vaccinated before onset of lay in order to protect its offspring by the transfer of antibodies via the egg yolk.

The two key requirements for any vaccine are (i) safety and (ii) efficacy. As vaccination is a medical treatment administered to healthy individuals, it is important that the vaccine does not cause undesired (negative) effects other than some transient minor discomfort. With regard to efficacy, the benefit in providing protection from disease and/or infection has to be demonstrated to justify the use. According to the applicable regulations in Europe and the majority of other countries, the safety and efficacy of a vaccine candidate has to be demonstrated in animal experiments. In addition, quality control tests may also require animal testing.

Vaccine research and development

Within a vaccine project three phases can be distinguished: the research phase, the development phase and the live cycle management phase.

The research phase comprises the search for [10.1 c en 10.2 g] [redacted]

[redacted] and strategies as well as expansion of the knowledge of known pathogens and technologies. For example, mechanisms of pathogenicity and natural and specifically induced immune responses or strategies of the pathogens to evade the immune response will be investigated, protective antigens might be identified or methods of attenuation of strains to create live vaccines or live [10.1 c en 10.2 g] vaccines might be investigated. Furthermore, during the research phase also new substrates (such as [10.1 c en 10.2 g] are developed and evaluated for their ability to culture existing vaccine strains and potential vaccine candidate strains.

Candidate vaccines are then tested in pilot studies to determine their efficacy and safety. Based on the outcome of these studies, candidate vaccines are selected to enter the development phase. In addition, in the research phase of the project (immunological or DNA/RNA-based) assays are developed (using antigenic components or pathogens) and biomaterials are prepared that are needed during the development phase of the project.

The current project proposal covers studies that are done during the research phase. The development and live cycle management phase are covered by a separate project proposal. The design of the studies and the procedures applied in the research studies are basically the same as for the development studies; to demonstrate essential aspects of efficacy and safety. In general, these are laid down in EU directives, the Pharmacopoeia Europaea (Ph.Eur.) and guidelines and regulations of the European Medicines Agency and other international regulatory bodies. However, during the research phase, less knowledge and experience is available on the different pathogens / vaccine candidates / adjuvants etc and therefore, the experimental design and animal numbers used for the studies may differ from those laid down in guidelines (are usually lower in the phase in which hypotheses are sorted out).

Below, some back-ground information is given about infectious diseases in poultry that are in scope for this project.

Diseases within the poultry vaccine research project

This vaccine research project targets diseases that have a major impact on the poultry industry (animal welfare, production losses, treatment costs) and / or Human Health concerns (zoonotic disease and reduction in the amount of antibiotics used). Typically, diseases with a high incidence in the poultry population are in scope. Diseases with a lower incidence but causing severe disease in animals and / or humans may also be considered.

The following infectious diseases are targeted within the poultry vaccine research projects in the

10.2.e.en.g

Viral pathogens:

AVIAN REOVIRUS

Avian Reovirus infections in chickens cause major economic problems for commercial poultry producers throughout the world. Avian Reoviruses have been associated with a variety of diseases, including viral arthritis/infectious tenosynovitis, runting and stunting (RRS) or malabsorption syndrome (MAS) resulting in growth retardation, pericarditis, myocarditis, enteritis, immunosuppression and central nervous symptoms. Vaccination programs are aimed at providing either direct immunity by live vaccination of chickens or immunization of breeders with live and or inactivated vaccines to transfer passive immunity to the progeny. For vaccination to have a chance of success, it must protect the birds at an early age.

10.1.c.en.10.2.g To protect against

10.1.c.en.10.2.g updated vaccines may be developed where 10.1.c.en.10.2.g are included. Vaccination studies with new vaccine formulations involve 10.1.c.en.10.2.g

10.1.c.en.10.2.g. Evaluation of the 10.1.c.en.10.2.g

10.1.c.en.10.2.g also includes the protection in 10.1.c.en.10.2.g of chickens. New vaccine formulations (using 10.1.c.en.10.2.g) and 10.1.c.en.10.2.g may add convenience for the user and thereby increase compliance and vaccine usage.

INFECTIOUS BURSAL DISEASE

Infectious Bursal disease (IBD), also called Gumboro disease, is an acute highly contagious viral infection in chickens. The virus (IBDV) has lymphoid tissue as its primary target with a selective tropism for cells of the bursa of Fabricius. The morbidity rate in susceptible flocks is high, with a rapid weight loss and moderate to high mortality rates. Chickens that recover from the disease may have immune deficiencies resulting from viral replication in and subsequent destruction of cells of the bursa of Fabricius. In the US, variant IBDV strains are of major concern. In other parts of the world, very virulent classical strains are causing several clinical outbreaks associated with high mortality. In Europe new variant IBDV strains have been isolated in Greece and in Belgium from progeny suffering from Gumboro disease. These new variant IBDV strains can be distinguished from other known classical and variant IBDV strains based on their reaction pattern with monoclonal antibodies or at the molecular level.

10.1.c.en.10.2.g. For vaccine development, 10.1.c.en.10.2.g

10.1 c en 10.2 g

Research on new IBD vaccines is needed for hatchery application but also in older birds for protection of the offspring. 10.1 c en 10.2 g. For vaccination in 10.1 c en 10.2 g vaccine research is performed for 10.1 c en 10.2 g and 10.1 c en 10.2 g. New vaccine formulations (using 10.1 c en 10.2 g and 10.1 c en 10.2 g) may add convenience for the user and thereby increase compliance and vaccine usage.

NEWCASTLE DISEASE VIRUS

Newcastle disease virus (NDV), a member of the paramyxoviridae family, is responsible for one of the most devastating diseases in poultry resulting in a substantial economic impact in the poultry industry around the world. Clinical signs depend on the age of the host, virulence of the virus strain, its tropism and the host's immune status. Velogenic NDV strains can induce high mortality, clinical signs including listlessness, severe respiratory signs, muscular tremors, torticollis, paralysis of legs and wings, drop of egg production, etc. Mesogenic NDV strains usually cause predominantly respiratory disease. A drop in egg production and nervous signs may occur. Mortality is usually low. Lentogenic NDV strains usually cause no disease in adult birds. In young, fully susceptible birds, serious respiratory disease can be seen. In most parts of the world, chickens and turkeys are protected against NDV by vaccination. A standard NDV vaccination programme consists of a number of vaccinations with conventional live NDV vaccines (mostly starting at 1 day of age and including revaccinations approximately every 4 weeks) and a vaccination with an inactivated NDV vaccine to insure high maternally derived antibodies in the progeny before lay (14-20 weeks). Conventional live NDV vaccines can induce some respiratory signs and/or conjunctivitis that can be aggravated by secondary bacterial infections. Newcastle disease virus can be transmitted to humans and is therefore considered as a zoonotic agent.

10.1 c en 10.2 g

Research on new NDV vaccines is needed for 10.1 c en 10.2 g. For example, 10.1 c en 10.2 g need investigation. For vaccination in 10.1 c en 10.2 g) research is ongoing for 10.1 c en 10.2 g

Furthermore, new vaccine 10.1 c en 10.2 g) and 10.1 c en 10.2 g are also in scope as these may add convenience for the user and thereby increase compliance and vaccine usage.

AVIAN METAPNEUMOVIRUS (AMPV)

Avian metapneumovirus (AMPV), also known as Avian Rhinotracheitis (ART) is a disease initially recognized in turkeys and caused by Avian rhinotracheitis virus (ARTV), a pneumovirus classified within the Paramyxoviridae family of viruses although with a gene order different to that of other pneumoviruses. Initially the disease was called Turkey Rhinotracheitis (TRT). The virus has a characteristic pleomorphic shape and fails to haemagglutinate turkey, chicken, human and guinea pig red blood cells. Only one serotype of virus has been identified although monoclonal antibodies showed some diversity between isolates obtained in the UK and elsewhere.

The disease is widespread, having first been described in South Africa in the 1970s followed by Israel, France, Germany, England and Wales. Pneumovirus infections are currently widespread throughout Europe, South and Central America and the Middle and Far East.

The disease is characterized by snicking, tracheal rales, nasal mucoid discharge and watery eyes. Submaxillary oedema and swelling of the infraorbital sinus is usually present. There is often a drop in feed consumption. Morbidity may reach 100% whilst mortality can reach 30-50%, depending on the secondary organism(s) involved and the age at the time of infection. Mycoplasma and other bacteria (E.

coli, Klebsiella, Staphylococci, Streptococci, Proteus spp. and Alcaligenes faecalis) have been isolated as secondary infections from outbreaks of ART. After replicating at the initial site(s) of infection, the virus can spread to the reproductive tract and in laying birds the virus can cause a severe drop in egg production of 60 to 98%. ART antigen has been detected in the magnum and isthmus after infection via the nares.

10.1 c en 10.2 g [REDACTED]. New vaccine 10.1 c en 10.2 g [REDACTED]) and 10.1 c en 10.2 g [REDACTED] may add convenience for the user and thereby increase compliance and vaccine usage.

INFECTIOUS BRONCHITIS

Avian Infectious Bronchitis is an acute, highly contagious respiratory disease of chickens caused by a Coronavirus. The disease is characterized by tracheal rales, coughing, and sneezing. In addition to the respiratory signs, chickens may show urogenital symptoms and develop kidney disease and in laying flocks there is usually a drop in egg production. Infectious Bronchitis (IB) is of substantial economic importance to the poultry industry. In laying flocks the major loss is related to a decreased production and poor egg quality. Immunization against IB has been shown to be efficacious and plays a very important role in the control of this disease.

Many serologically different strains have been found; these isolates of IBV can be grouped in serotypes, the number of types depends on the serological technique utilized in the assessment. New variants have also been occurring over the last decade. The challenge for vaccination against IB is to find vaccines which cover a broad range of prevailing strains.

Vaccination against IB is performed from day old with live vaccines and multiple vaccinations are given. Also at 14-20 weeks of age an inactivated vaccine is given to protect against IB during the laying period.

10.1 c en 10.2 g [REDACTED]. In addition, research

10.1 c en 10.2 g [REDACTED]. In addition, new vaccine 10.1 c en 10.2 g [REDACTED]) and 10.1 c en 10.2 g [REDACTED] may add convenience for the user in the field.

EGG DROP SYNDROME

In 1976 an egg drop syndrome was described in laying hens leading to the name of the disease "egg drop syndrome '76". Since the initial description, EDS has been observed in many countries throughout the world. This syndrome is attributed to an adenovirus which is able to agglutinate chicken red blood cells, a property which has not been found for any other chicken adenovirus. By serological analysis only one serotype has been recognized. The prominent symptom is a drop in egg production which often starts before the peak production is reached. The symptom has also been observed at later stages of the laying period. In addition to the drop in egg production, thin-shelled and soft-shelled eggs, shell-less eggs or, in brown egg layers, colorless eggs, may be found. The symptoms of egg drop usually last approximately 4 to 10 weeks and egg production can be reduced by up to 40%; however, production tends to return to normal levels for the type of birds at that age. The birds may show as additional symptoms a slight diarrhea during a few days and sometimes combs are relatively pale. Oil adjuvanted inactivated vaccines are widely used and give good protection against clinical disease and drop in egg production.

10.1 c en 10.2 g [REDACTED] s. New vaccine 10.1 c en 10.2 g [REDACTED]) and 10.1 c en 10.2 g [REDACTED] may add convenience for the user in the field.

MAREK'S DISEASE

Marek's Disease (MD) is a highly contagious, lymphoproliferative disease of chickens and is caused by a herpesvirus known as Marek's disease virus (MDV). Three serotypes have been described: serotype 1 includes pathogenic isolates of chicken origin and their attenuated derivatives, serotype 2 includes the naturally apathogenic isolates of chicken origin, and serotype 3 includes the naturally apathogenic isolates of turkey origin known as turkey herpesvirus (HVT). Vaccines derived from all three serotypes are available and used alone or in combinations to provide protection against MD in the field. Vaccination is performed either in ovo or in one-day-old chickens by injection.

10.2 . e. en g [REDACTED]

HVT has also become widely used as a vector vaccine. Genes from other pathogens are in that case

inserted in the HVT genome resulting in an HVT vector vaccine which not only protects against MD but also against the other diseases (e.g. after insertion of the F protein of NDV, protection is also obtained against ND). The advantages of the HVT vector vaccine are: the vaccine is safe (HVT is naturally apathogenic) and both humeral and cellular immune responses against pathogens are induced. Furthermore, a lifelong duration of protection is induced as HVT remains present in the birds for life.

10.1 c en 10.2 g

In all cases the vaccine viruses are cell associated and therefore the product is presented frozen and stored at low temperature (e.g. in liquid nitrogen). The vaccines are applied using a solvent which support stability of the live cells.

10.1 c en 10.2 g

where 10.1 c en 10.2 g research may however also relate to 10.1 c en 10.2 g and therefore 10.1 c en 10.2 g research is the 10.1 c en 10.2 g and solutions which may 10.1 c en 10.2 g

INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS

Infectious laryngotracheitis (ILT) is a viral respiratory tract infection in chickens which is caused by infectious laryngotracheitis virus (ILTV) or Gallid herpesvirus 1. This virus is classified as a member of the genus Iltovirus within the family of Herpesviridae, subfamily Alphaherpesvirinae. ILT is a viral respiratory tract infection that may cause performance losses and decreased egg production.

Two forms of ILT are recognized: that is the mild and the severe ILT forms. Clinical signs associated with the mild form include (haemorrhagic) conjunctivitis, swelling of the sinuses, watery eyes, nasal discharge and mild tracheitis. The mild form results in morbidity as low as 5% and very low mortality (0.1-2%). Clinical signs associated with the severe form of the ILT virus include coughing, gasping, marked dyspnoea, respiratory depression, expectorations of bloody stained mucus. The severe form causes high morbidity (90-100%) and variable mortality (5-70%) but usually in the range of 10-20%. In the field clinical signs appear 6-12 days after infection. Experimental inoculation via the intratracheal route results in a shorter incubation period of 2-4 days. The disease often persists for as long as two to six weeks, and the virus can be latently present in a low percentage of the birds of an infected flock and might reappear after a stress period.

Prevention of ILT has been obtained by vaccines consisting of attenuated live ILTV strains of low virulence derived by serial passaging in cell culture or embryonated chicken eggs. Although highly efficacious, attenuated live ILT vaccines have been associated with some negative properties, such as spread of vaccine virus to non-vaccinates, insufficient attenuation, production of latently infected carriers and increased virulence as a result of bird-to-bird passage. Live vaccines are normally administered to chickens older than 2 weeks, as younger chickens do not respond as well and severe reactions are more likely to occur in younger chickens.

10.1 c en 10.2 g

10.1 c en 10.2 g research 10.1 c en 10.2 g for vaccines like e.g. 10.1 c en 10.2 g which also may have 10.1 c en 10.2 g Future research may include investigation of 10.1 c en 10.2 g

AVIAN INFLUENZA

Avian influenza is a respiratory infectious disease caused by Avian Influenza virus (AIV), which is member of the genus Influenzavirus A belonging to the Orthomyxoviridae family. Surface proteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) are the most prominent features of the viral envelope and are used to subtype the virus strains. Currently 18 HA and 10 NA subtypes are identified within the Influenzavirus A of which HA 1-16 and NA 1-9 can be found within the avian influenza viruses. The other subtypes have only been found in bats. AIV strains can further be classified into 2 groups: highly pathogenic avian influenza (HPAI) and low pathogenic avian influenza (LPAI). HPAI viruses are very virulent viruses in which mortality rates may approach 100% and appear to be pantropic with respect to systemic virus replication and ability to produce gross lesions. The most severe lesions result in inflammation, haemorrhage with necrosis and cellular death of skin, brain, heart, adrenal gland,

pancreas and other visceral organs. Clinical signs associated with HPAI are sudden death without clinical signs, lack of energy and appetite, decreased egg production, soft-shelled or misshapen eggs, swelling of the head, eyelids, comb, wattles and hocks, purple discoloration of the wattles, combs, and legs, nasal discharge, coughing, sneezing, incoordination and diarrhea. These viruses have been restricted to subtypes H5 and H7. Infections with H9 AI virus strains although of low pathogenicity, do have a negative influence on flock performance especially if they occur in combination with other pathogens. Outbreaks of avian influenza (AI) caused by infection with low pathogenic H9N2 viruses have occurred in poultry, resulting in serious economic losses in Asia and the Middle East. All other viruses are designated LPAI viruses causing milder infections and appear to be restricted in their capability for replication and production of lesions in individual organs and tissues. Lesions were detected in the ovary and oviduct and congestion of the lung and trachea. No or few clinical signs are observed.

10.1 c en 10.2 g

is performed.

Other 10.1 c en 10.2 g

) influenza vaccines 10.1 c en 10.2 g

influenza vaccines. The 10.1 c en 10.2 g

. The use of these vaccines will be 10.1 c en 10.2 g

influenza virus infection in poultry.

CHICKEN ANAEMIA VIRUS

Chicken anaemia agent (CAA, also known as CAV = chicken anaemia virus) is the causative agent of avian infectious anaemia. The only known host for CAA, an agent which appears to be ubiquitous in all major chicken producing countries of the world, is the chicken. All ages are susceptible to infection but susceptibility to disease rapidly decreases during the first 2 - 3 weeks of life. Development of age resistance is considerably delayed and morbidity as well as mortality are enhanced if chicks are dually infected with CAA and with MDV, REV or IBDV, probably due to virus induced immunosuppression. CAA spreads both vertically and horizontally in chickens.

Vertical transmission occurs following primary infection of in lay breeding stock and results in clinical disease in their progeny towards the end of the second week of their life. These birds become anorexic and depressed with pallor of the comb and wattles and ruffled feathers. The main characteristics of the disease are growth depression and increased mortality. The disease is acute. Mortality, generally between 10-20% but occasionally up to 60%, peaks within 5-6 days after onset of disease signs and mortality has often declined to normal levels after a further 5 to 6 days. Affected birds often have focal skin lesions which are prone to secondary bacterial infection leading to gangrenous dermatitis. Affected birds suffer from an anaemia with a peak at 14-16 days post hatching as indicated by hematocrit values ranging from 6-26% whereas at necropsy thymus atrophy and pale fatty bone marrow are the most predominant signs.

Horizontal spread occurs through contact with vertically infected chickens, contaminated vomites, houses, etc. and infection during the first days of life results in clinical disease as described above. Horizontal infection in older birds may result in subclinical disease but both clinical and subclinical infection cause economic losses.

The physical resistance of CAA to inactivation is relevant in context of horizontal spreading.

The presence of maternal antibody is protective in experimental infections with CAA and CAA associated disease does not appear to occur in the progeny of immune breeder flocks. Therefore, immunization of breeding stock, several weeks before onset of lay will efficiently prevent outbreaks of infectious anaemia caused by CAA in their progeny. Furthermore, if high uniform antibody levels can be induced in breeding stock, the resulting high levels of maternally-derived antibody (MDA) may prevent or at least delay horizontal infection in the progeny and thus prevent or decrease economic losses due to disease in the first weeks of their life.

10.1 c en 10.2 g

vaccine formulations (using 10.1 c en 10.2 g

10.1 c en 10.2 g

) and 10.1 c en 10.2 g may add convenience for the user in the field.

FOWL POX VIRUS

Pox is a common viral disease of domestic birds (e.g. chickens, turkeys, pigeons and canaries). It is a slow-spreading disease characterized by the development of discrete, nodular proliferative skin lesions on the unfeathered parts of the body or fibrinonecrotic and proliferative lesions in the mucous membrane of the upper respiratory tract, mouth and oesophagus. Poxvirus infection occurs through mechanical transmission of the virus to the injured or lacerated skin. Insects mechanically carrying the virus may deposit it in the eye. In a contaminated environment the aerosol generated by feathers and dried scabs containing poxvirus particles provide suitable conditions for cutaneous and respiratory infection. Mortality in chickens is usually low but in severe cases it may be as high as 50%. Morbidity rate of pox in chickens varies from a few birds being infected to involvement of the entire flock if a virulent virus is present and no control measures are taken.

10.1 c en 10.2 g vaccine formulations (using 10.1 c en 10.2 g 10.1 c en 10.2 g) and 10.1 c en 10.2 g may add convenience for the user in the field.

AVIAN ENCEPHALOMYELITIS VIRUS

Avian encephalomyelitis (AE) is a viral disease of young chickens caused by a virus from the Hepatovirus family and characterised by central nervous system signs (Epidemic Tremors). It can be the cause of significant economic loss. Chickens of all ages are susceptible, but clinical signs of encephalitis only develop in those younger than three weeks. In older birds a drop in egg production is most commonly observed. The disease is similar in turkeys and chickens. Under field conditions disease is most common in the 1–2 week age group. If the disease is present in older birds the most common symptom is a drop in egg production. AE virus is transmitted both vertically and horizontally i.e. through the egg and by contact. Eggs laid by hens with sub-clinical infection will carry the virus. While hatchability drops, eggs will hatch and chicks will develop clinical disease soon after. Affected chicks shed virus in faeces and will infect susceptible in-contact chicks.

10.1 c en 10.2 g vaccine formulations (using 10.1 c en 10.2 g 10.1 c en 10.2 g) and 10.1 c en 10.2 g may add convenience for the user in the field.

AVIAN ADENOVIRUSES

Adenoviruses are widespread throughout all avian species. Studies have demonstrated the presence of antibodies in healthy poultry, and viruses have been isolated from normal birds. Despite their widespread distribution, most adenoviruses cause no or only mild disease; however, some are associated with specific clinical conditions. Avian adenoviruses (AAVs) (also known as fowl adenovirus (FAdV)) in chickens are the etiologic agents of two important diseases known as inclusion body hepatitis (IBH) and hydropericardium syndrome (HPS). Although in some cases each disease is observed separately, the two conditions have been frequently observed as a single entity; therefore, the name hepatitis hydropericardium has been widely used to describe the pathologic condition. The syndrome is an acute disease of young chickens associated with anaemia, haemorrhagic disorders, and hydropericardium. It is a common disease in several countries, where broilers are severely affected, resulting in high mortality rates.

The AAVs classified in the genus Aviadenovirus (formerly group I) are the etiologic agents of this condition. Although there are 12 different serotypes of AAV, the most common viruses isolated in cases of IBH/HP belong to serotypes 4 and 8. These AAVs are capable of producing the disease without the immunosuppressive effects of associated viruses such as infectious bursal disease (IBDV, see Infectious Bursal Disease) or other immunosuppressive agents. However, the association with immunosuppressive viruses such as IBDV and chicken anaemia virus (CAV, see Chicken Anaemia Virus Infection) will result in a more severe disease.

Horizontal and vertical transmission play an important role in IBH/HP. Vertical transmission has been described in progeny from breeder flocks infected with AAV serotypes 4 and 8. Horizontal transmission has also been demonstrated; young chicks in contact with infected chicks can die of peracute IBH/HP. Infection with some strains of AAVs may result in minimal hepatic disease; however, if birds have been infected with immunosuppressive viruses (IBDV, CAV, Marek's disease), the clinical disease becomes evident.

Sudden mortality usually is seen in chickens <6 wk old and as young as 4 days of age. Mortality normally ranges from 2%–40%, especially when birds are <3 wk old. However, in some outbreaks, mortality has

reached 80%. Mortality rates also vary depending on the pathogenicity of the virus and infection with other viral or bacterial agents.

Flocks of 3- to 5-wk-old broilers with HP may not show specific clinical signs, but abrupt onset of mortality, lethargy, huddling with ruffled feathers, and yellow, mucoid droppings may be seen. The duration of the infection usually ranges from 9–14 days with morbidity of 10%–30% and a daily mortality of 3%–5%. Gross lesions include as much as 10 mL of a straw-coloured transudate in the pericardial sac, generalized congestion, and an enlarged, pale, friable liver. Histopathologic lesions include myocardial oedema in the heart with degeneration, necrosis, and mild mononuclear cell infiltration. Basophilic intranuclear inclusion bodies may be present in the liver.

Development of vaccines would significantly help the poultry industry but is not straight forward as many different serotypes exist.

AVIAN ASTROVIRUSES (CASTV, ANV)

Avian nephritis viral infections are contagious infections of chickens characterized by renal damage and visceral urate deposits, growth retardation, and limited mortality (0–10%). They are seen mainly in chickens <7 days old, but interstitial nephritis can be seen in chicks as old as 4 weeks. These infections have been reported worldwide. Subclinical infections are common and have been detected by serologic surveys in some SPF flocks and in turkeys.

The causal viruses are avian nephritis viruses (ANVs, which are astroviruses), some of which were previously recognized as enterovirus-like viruses (ELVs). There is some evidence that a taxonomically distinct astrovirus, chicken astrovirus (CAstV), also causes kidney disease and growth retardation. Strains of ANV vary in virulence and in antigenicity. Transmission occurs by direct or indirect contact. Indirect evidence suggests that egg transmission may occur. Infection can be transmitted by oral administration of virus to day-old birds.

Clinical signs vary from none to mortality resulting from kidney disease or severe growth retardation. Diarrhea and growth retardation are common in broilers. Outbreaks with mortality of 0–10% can occur in chicks newly hatched to as old as 7 days; cardinal necropsy findings are renal damage and visceral urate deposits (baby chick nephropathy).

There are currently no vaccines for astroviruses for poultry; the development of effective vaccines could be of benefit for the poultry industry.

Bacterial pathogens

INFECTIOUS CORYZA

Infectious coryza is an acute respiratory disease of chickens caused by *Haemophilus paragallinarum*. It may occur worldwide in growing chickens and layers and causes economical losses due to an increased number of culls and a marked (10% to more than 40%) drop in egg production, particularly on multi-age farms. The most common clinical signs are nasal discharge, facial swelling, lacrimation, anorexia and diarrhea. Decreased feed intake and water consumption retards growth in young stock and reduces egg production in laying flocks. In the uncomplicated infection, mortality is low. But infectious coryza can be complicated by other pathogens and stress factors. Unique clinical presentations such as arthritis and septicemia, presumably complicated by the presence of other pathogens, such as *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp., avian rhinotracheitis virus and infectious bronchitis virus, have been found in broiler and layer flocks. Overall it can be stated that the clinical signs and economic impact of the complicated coryza infections seen in developing countries can be markedly different from those in the uncomplicated infections typically seen in developed countries.

It is well established that active acquired antibodies after vaccination play an important role in the prevention of infectious coryza in chickens. Vaccination of the birds is therefore generally considered to be the optimal strategy to prevent these problems.

From the early days of *H. paragallinarum* bacterin (inactivated whole cell vaccine) production, it was obvious that protection was immunotype specific and that cross-protection was limited against the Page serotypes in the vaccine. Furthermore, Yamaguchi et al. found only partial cross-protection within various strains of serotype B. Outbreaks of infectious coryza were reported in different countries despite routine vaccination with currently available commercial vaccines, including the trivalent vaccines. These outbreaks indicate a new serotype of *H. paragallinarum*: variant type B. This implies that an inactivated vaccine must include at least all three Page serotypes preferably supplemented with the emerging new immunotype to provide protection against infectious coryza.

pathogens. [REDACTED] vaccine formulations (using [REDACTED] and [REDACTED] may add convenience for the user in the field.

E. COLI

A number of diseases in poultry are attributed to *E.coli* infections (colibacillosis) including omphalitis, colisepticemia, airsac disease, enteritis, arthritis, salpingitis/peritonitis, coligranuloma and panophthalmia. These diseases are responsible for major economic losses to the poultry industry. Colibacillosis is regarded as the most important bacterial infection in intensive poultry farming and above all in the broiler sector.

The pathogenesis of colibacillosis has been described and extensively reviewed in literature. Infection of eggs may lead to embryo and early chick mortality. Aerogenic infection may lead to airsac disease, a secondary infection, particularly in young birds and poults.

Airsac disease is characterized by a subacute fibrino purulent polyserositis. A severe airsacculitis is present, often accompanied by pericarditis and perihepatitis.

Colibacillosis is spread worldwide, which is illustrated by relevant literature from different countries. Important economic losses occur as a result of mortality, but especially due to retardation of growth, bad feed conversion, diminished quality or condemnation at slaughter, and cost of medical treatment. Colibacillosis continues to be an important disease in the broiler industry. To reduce the need of the extensive application of antibiotics the role of vaccination against colibacillosis becomes more and more important.

[REDACTED] vaccine formulations (using [REDACTED] and [REDACTED] may add convenience for the user in the field. [REDACTED] development of [REDACTED] *E.coli* vaccines [REDACTED].

ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE

Erysipelas in birds is generally an acute and fulminating infection of individuals within a flock. It is caused by the bacterium *Erysipelothrix rhusiopathiae*, which is worldwide in distribution. Erysipelas outbreaks of economic significance are uncommon in avian species other than turkeys.

E. rhusiopathiae also causes swine erysipelas and erysipeloid in humans. The adaptiveness of the organism is indicated by its ability to infect a wide variety of vertebrate species. It has been isolated from tissues of many different bird species, mammals, reptiles and amphibians, as well as surface slime of fish.

Active immunization against turkey erysipelas is mainly carried out by the use of a formalin-inactivated aluminium hydroxide-adsorbed, whole cell *E. rhusiopathiae* bacterin. These bacterins were initially developed for use in swine but were also shown to be effective in preventing erysipelas in turkeys. Only certain strains of *E. rhusiopathiae* belonging to serotype 2, however have been effective for use in bacterins. These strains form a soluble immunizing product when grown in a complex medium containing serum. This product, which is released into the medium, has been described as a glycolipoprotein. Its formation is enhanced specifically by serum, and is considered by most investigators to be a necessary component for stimulation of immunity by the bacterin. This soluble immunizing substance is adsorbed and precipitated by aluminium hydroxide or other suitable adjuvant which also adsorbs whole cells. Original efficacy demonstrations in turkeys were based on intramuscular injections. Currently subcutaneous inoculations are used, to avoid local reactions in the meat.

[REDACTED] vaccine formulations (using [REDACTED] and [REDACTED] may add convenience for the user in the field.

MYCOPLASMA

Mycoplasmas are very small prokaryotes lacking a cell wall, confined by a plasma membrane only. They have complex nutritional requirements and as such are obligate parasitic organisms. They are found in many organisms, ranging from humans, animals, and insects to plants, but are quite host-specific. The Pathogenic avian mycoplasmas are *Mycoplasma gallisepticum*, and *M. synoviae* which infect both chickens and turkeys. *M. meleagridis* and *M. iowae* have only been found in turkeys.

Infections with *M. gallisepticum* leads to nasal discharge, coughing, sneezing, tracheal râles, sinusitis and conjunctivitis. Other consequences are poor weight gain, downgrading at slaughter (airsacculitis), reduced production in layers and reduced hatchability and livability of chicks. In some cases lameness, nervous signs, and salpingitis can be seen.

M. synoviae infection most frequently occurs in chickens as a subclinical upper respiratory infection. Depending on condition of the chicken, *M. synoviae* may cause air sac lesions. *M. synoviae* infection may

become systemic and result in infectious synovitis, an acute to chronic infectious disease of chickens and turkeys, involving primarily the synovial membranes of joints and tendon sheaths producing an exudative synovitis, tenovaginitis, or bursitis.

Effective vaccination strategies can only sufficiently be provided by live attenuated vaccines. For inactivated vaccines larger amounts of antigenic material is required to induce an effective immune response, making inactivated vaccines more expensive and labour intensive. The parenteral route of administration is not optimal for vaccinating large numbers of chickens. Live attenuated vaccines more closely mimic natural infection, fuelling a highly adaptive immune response by the vaccine. As a consequence less antigenic material is required. Furthermore, administration can also be performed by spray-vaccination.

10.1 c en 10.2 g vaccine formulations (e.g. using 10.1 c en 10.2 g and 10.1 c en 10.2 g) may further add convenience for the user in the field.

SALMONELLA

Different Salmonella serovars exist. Infection of poultry with salmonella has also important public health significance, particularly infection with the invasive strains. *S. enteritidis* and *S. typhimurium* have emerged as the most frequent infections of poultry and have been associated with many cases of human food poisoning. The poultry industry has made great efforts to control these salmonellae, by vaccination, by the use of bacteriological testing and removal of infected birds, by improved hygiene and careful selection of breeding stock.

Salmonella gallinarum is recognized as the causative agent of fowl typhoid (FT), which is a typical poultry disease and which appears to be distributed world-wide. *S. gallinarum* has a high host specificity for chickens and to a lesser extent for turkeys. Birds which are clinically ill are lethargic and anorexic with pale wattles and comb and produce a green, foul diarrhea. Bacteria enter mainly by the oral route and once in the gut they invade and are taken to macrophages in the spleen and elsewhere where they multiply resulting in disease. They re-enter the alimentary tract during the later stages of clinical disease from where they are shed. Drops in egg production only occurs substantially in the very late stages of disease. Acute outbreaks cause severe economic losses due to mortality, production losses and costs of medication and sanitation.

S. Pullorum produces pullorum disease, a disease which is clinically very similar to human typhoid but with severe disease only in very young birds. As with *S. Gallinarum* transmission is faecal-oral in very young birds, occurring frequently in the hatchery where vertical transmission also occurs. Mortality varies also according to bacterial strain and host genetic background.

Food poisoning serovars are *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Montevideo*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar* and many others. The main concern is the potential threat they pose to human health. S.e. contamination is one of the major causes of food poisoning.

10.1 c en 10.2 g . Development of vaccines with 10.1 c en 10.2 g with 10.1 c en 10.2 g vaccines 10.1 c en 10.2 g Furthermore, 10.1 c en 10.2 g vaccine formulations (using 10.1 c en 10.2 g and 10.1 c en 10.2 g 10.1 c en 10.2 g) may further add convenience for the user in the field.

NECROTIC ENTERITIS (CLOSTRIDIUM PERFRINGENS)

Necrotic enteritis is an acute enterotoxemia. The clinical illness is usually very short, and often the only signs are a severe depression followed quickly by a sudden increase in flock mortality. The disease primarily affects broiler chickens (2-5 wk old) and turkeys (7-12 wk old) raised on litter but can also affect commercial layer pullets raised in cages.

The causative agent is the gram-positive, obligate, anaerobic bacteria *Clostridium perfringens*. There are two primary *C. perfringens* types, A and C, associated with necrotic enteritis in poultry. Toxins produced by the bacteria cause damage to the small intestine, liver lesions, and mortality.

C. perfringens is a nearly ubiquitous bacteria readily found in soil, dust, feces, feed, and used poultry litter. It is also a normal inhabitant of the intestines of healthy chickens and turkeys. The enterotoxemia that results in clinical disease most often occurs either after a change in the intestinal microflora or from a condition that results in damage to the intestinal mucosa (eg, coccidiosis, mycotoxicosis, salmonellosis, ascarid larvae). High dietary levels of animal byproducts (eg, fishmeal), wheat, barley, oats, or rye predispose birds to the disease. Anything that promotes excessive bacterial growth and toxin production or slows feed passage rate in the small intestine could promote the occurrence of necrotic enteritis. In

many cases, concurrent coccidiosis (especially *Eimeria maxima*, and *E. acervulina* to a lesser extent) is associated with outbreaks in commercial broilers, although recent investigations with NetB-positive isolates have reportedly caused disease without predisposition from *Eimeria* infections. Early mortality can be related to coccidiosis vaccination programs, with *Eimeria* cycling in these flocks.

Most often the only sign of necrotic enteritis in a flock is a sudden increase in mortality. However, birds with depression, ruffled feathers, and diarrhea may also be seen. The gross lesions are primarily found in the small intestine (jejunum/ileum), which may be ballooned, friable, and contain a foul-smelling, brown fluid. The mucosa is usually covered with a tan to yellow pseudomembrane often referred to as a "Turkish towel" in appearance. This pseudomembrane may extend throughout the small intestine or be localized. The disease usually persists in a flock for 5–10 days, and mortality is 2%–50%.

10.1 c en 10.2 g

CAMPYLOBACTER (*Campylobacter jejuni*)

Campylobacteriosis is a significant enterocolitis of people frequently acquired through consumption of undercooked poultry meat contaminated with *Campylobacter jejuni*. It is the leading bacterial cause of sporadic enteritis in developed countries. It can also be acquired from handling backyard poultry as well as diarrheic companion animals and from contaminated water. The organism colonizes the intestine of chickens, turkeys, and waterfowl but is generally nonpathogenic in birds. Some strains of *C. jejuni* have been reported to cause enteritis and death in newly hatched chicks and poults; however, it has not been possible to satisfy Koch's postulates and reproduce the syndrome previously termed "avian vibronic hepatitis" by administering isolates of *C. jejuni* to chickens.

It is estimated that more than half of all commercial broiler and turkey flocks harbor *C. jejuni*, although the prevalence can vary from 0% to 100% depending on season (lowest in fall and winter and highest in summer). Many chicks are colonized with *Campylobacter* spp early in life with no associated clinical signs or pathology. Most chicks display no lesions associated with *Campylobacter* infection. Some studies have reported that challenged chicks may exhibit distention of the jejunum, disseminated hemorrhagic enteritis, and in some cases, focal hepatic necrosis. Microscopic lesions of infected chicks include edema of the mucosa of the ileum and cecum with *C. jejuni* in the brush border of enterocytes. Mononuclear infiltration of the submucosa and villous atrophy occur, with intraluminal accumulation of mucus, erythrocytes, and mononuclear and polymorphonuclear cells. However, infected flocks seldom exhibit increased mortality rates or decreased feed conversion. It is unclear whether these findings represent a true clinical syndrome in chicks, because challenge studies frequently result in no lesions.

10.2 .e. en g

Parasitic pathogens

COCCIDIOSIS

Coccidiosis is caused by protozoa of the phylum Apicomplexa, family Eimeriidae. In poultry, most species belong to the genus *Eimeria* and infect various sites in the intestine. The most common species are *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* and *E. tenella*.

The infectious process is rapid (4–7 days) and is characterized by parasite replication in host cells with extensive damage to the intestinal mucosa. Poultry coccidia are generally host-specific, and the different species parasitize specific parts of the intestine.

10.1 c en 10.2 g . Development of 10.1 c en 10.2 g proved vaccines and

10.1 c en 10.2 g are part 10.1 c en 10.2 g

Current Coccidiosis vaccines are produced in chickens as these parasites do not replicate outside of the host, 10.1 c en 10.2 g

10.1 c en 10.2 g

HVT is broadly used as a vector system to protect chickens against other diseases for which genes have been inserted in the vector (see description above under 'Marek's disease'). Research 10.1 c en 10.2 g

. The 10.1 c en 10.2 g viruses 10.1 c en 10.2 g

are 10.1 c en 10.2 g

Assessment of the efficacy and safety 10.1 c en 10.2 g

. The outcome of 10.1 c en 10.2 g

Minor pathogens and new diseases / research areas

Besides the pathogens listed above, a number of infectious diseases are considered as minor pathogens because of the research attention it obtained in the past or e.g. the milder clinical signs induced by the pathogen or the limited geographical spread of the pathogen. Examples of (but not limited to) these are Avian Leucosis Virus, other Avian Paramyxoviruses (PMV-2, -3, -6, and -7), Hemorrhagic Enteritis Virus (HEV), Reticuloendotheliosis Virus, Rotaviruses, Avian Hepatitis E Virus, *Pasteurella multocida* (Fowl Cholera), *Staphylococcus spp* (Staphylococcosis), *Streptococcus spp* (Streptococcosis), *Enterococcus spp* (Enterococcosis), *Cryptosporidium spp* (Cryptosporidiosis), *Histomonas spp* (Histomoniasis). However, it cannot be excluded that some of these pathogens might be able to cause significant disease in poultry in the future and cause serious problems to the poultry industry e.g. by enlarging their geographical distribution, by an increase in virulence or by changes in poultry management conditions (e.g. by reduction of antibiotic usage) and will therefore receive more research attention than in the past. In addition, novel pathogens can emerge that cause large outbreaks in the field that require immediately attention and thereby become new focus areas of our research.

Research projects are ongoing that address alternative or new vaccine formulations to improve vaccine characteristics (10.1 c en 10.2 g [redacted]) or address alternate ways to deliver vaccines (10.1 c en 10.2 g [redacted]).

In addition, (10.1 c en 10.2 g [redacted])

[redacted]s are evaluated for their immunostimulatory activities to aid in improvement of the immune response and protection against the pathogen or (10.1 c en 10.2 g [redacted])

For some diseases, (10.1 c en 10.2 g [redacted]) might be an alternative approach to aid in the protection against certain infectious diseases.

Once these research projects deliver promising results, they will be applied to update vaccines or develop new vaccines.

Furthermore, (10.1 c en 10.2 g [redacted]) results in the exposure of chickens to (10.1 c en 10.2 g [redacted]) that can have direct negative effects on the chicken's health or can have immunomodulating properties that interfere with an effective response to vaccination against other diseases. Therefore, protection against (10.1 c en 10.2 g [redacted]) is a new area of interest to (10.2 e. en g [redacted]).

Several aspects that may determine the need for (new) vaccines:

- A) (Acute) diseases with high production losses and/or high treatment costs (if applicable) have severe negative economic impact for the poultry producer. Vaccination aims at reduction of these losses.
- B) Diseases that are associated with severe discomfort and high mortality like Infectious Laryngotracheitis or Marek's disease. Prevention of these diseases clearly improves the animal welfare.
- C) Convenience for the poultry farmer. Improvement of vaccine administration techniques and strategies (e.g. hatchery application or mass application) are beneficial for the poultry farmer.
- D) Outbreaks of diseases like (high pathogenic) Avian Influenza or Newcastle Disease have major economic impact and are therefore part of national control programs. Vaccination can be a tool to control a pathogen and reach the status "free of", which has trade benefits.
- E) The need to reduce antibiotic use is of great importance in the poultry industry. Good management procedures and vaccination programs can help.
- F) Zoonotic pathogens (for instance pathogens that induce food borne diseases) may not only be harmful for poultry but also for human. Inclusion in the poultry vaccination program may therefore be dual beneficial.

R&D projects and historical progress

Work carried out during the last five years has been successful in bringing a number of new products to the market (10.1 c en 10.2 g [redacted]).

In addition, studies were undertaken to show compatibility of existing and new products to be able to give sound advice on the vaccination schedules to be used in the field and to obtain label claims for

associated use, i.e. mixing or application of two or more vaccines at the same time.

Whereas one could argue that no further work is needed once a vaccine against a certain pathogen has been developed, in reality the optimization of the [10.2.e.en.g] vaccine range is a continuous process. The company aims to improve its products to [10.1.c.en.10.2.g]

[redacted] less stressful for the animal (improved animal welfare) and [10.1.c.en.10.2.g]. For instance, [10.1.c.en.10.2.g] and are therefore advantageous from an animal welfare as well as from a farm management perspective. Development of [10.1.c.en.10.2.g]

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?

The overall goal of the poultry vaccine research project is to update the current vaccine portfolio in response to unmet needs in the field of the poultry industry. More specifically, the first aim is to identify [10.1.c.en.10.2.g], expand the knowledge of known pathogens to be able to develop new (combination) vaccines and test candidate vaccines against these pathogens. In addition, the second aim is to evaluate [10.1.c.en.10.2.g]

[redacted] to be able to improve our poultry vaccine portfolio and meet the customer's needs.

The outcome of a successful research phase is the discovery of a new (serotype of a) pathogen and/or a new prototype vaccine that has shown to be safe and efficacious in the chicken (proof of concept) and can therefore later on successfully pass the development phase.

In addition, another objective in the research phase of the project is the design/development of [10.1.c.en.10.2.g] assays (using antigenic components or pathogens).

3.3 Relevance

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

Vaccines are the most effective method for prevention or eradication of diseases. Further improvement and extension of the available vaccine range will bring safer, more efficacious vaccines, including vaccines against emerging diseases. Also, combinations of diseases can be encountered more effectively, with fewer vaccination moments (injections) and/or mass application, [10.1.c.en.10.2.g] vaccines are developed or vaccines that can be used at the same time or mixed with other vaccines, or even in ready to use combination products.

The prospects are that the new vaccines will further reduce animal suffering and the use of antibiotics, and will lead to reduced losses in meat and egg production and thereby to a more sustainable use of natural resources.

Acquired insight in pathogenesis and immune responses of infections will help to identify new vaccination or [10.1.c.en.10.2.g] for those pathogens for which no efficacious vaccine exists at this moment.

3.4 Research strategy

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

At the [10.2.e.en.g], all R&D projects are subject to [10.2.e.en.g]y. Only research projects that provide a (medical) need, have a reasonable market expectation and probability of success will get approval to start the research phase. At the start of a research project, the project team agrees on the types of studies to be performed and the requirements for the studies.

Infection studies in the target animal (chickens) have to be undertaken to show that a (newly isolated) infectious agent is pathogenic and fulfils Koch's postulates and to better understand the mechanisms of

pathogenicity and immune response after infection. These infection studies can also form the basis for a target animal (chicken) infection model that will be used to test the efficacy of vaccine candidates (vaccination-challenge studies). Such an infection model is needed to be able to show that a vaccine is capable to prevent or significantly reduce infection and/or clinical signs. For vaccines against some pathogens, the infection model that has to be used and the specific efficacy criteria that have to be fulfilled are prescribed in a monograph of the Ph.Eur.

The number of vaccine candidates tested in vaccination-challenge studies is reduced as much as possible. Selection criteria applied comprise the growth characteristics, immunological properties determined *in vitro*, safety and efficacy data obtained from other vaccines (poultry and non-poultry). When doing (initial) vaccination-challenge studies, it is attempted to find an immunological correlate of protection, so that in further studies efficacy can be evaluated on the basis of e.g. the serological response after vaccination instead of challenge.

Safety of vaccine candidates also has to be evaluated in the target animals (chickens) to show that systemic and local (injection site) reactions after vaccination, if any, are acceptable. For each new vaccine, a risk-benefit analysis has to be made and the aim is to induce as little as possible discomfort by vaccination.

In the research phase, safety and (serological) efficacy parameters are measured simultaneously in combined orientating efficacy and safety studies.

It is expected that **[REDACTED]** different pathogens will be investigated within this project, prioritized based on medical need and feasibility of vaccine production.

In some early research project **[REDACTED]** chickens may be used. **[REDACTED]**

[REDACTED]. Usage of **[REDACTED]** animals permits a detailed and dynamic visualization of diverse processes such as innate immune reactions as a consequence of immunization with a particular vaccine or aid in the search for correlates of protection. This model animal can be used to investigate immunological processes in detail and to subsequently optimize efficacy of current vaccine formulations and/or development of new vaccine formulations.

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.

The research phase for new vaccines consist of one or more of the following types of animal experiments (described in detail in appendices 1 through 4).

Ad 1) Infection studies

An infection model for a pathogen is developed based on the scientific literature or a Ph.Eur monograph (if available) and the experience with other pathogens within the **[REDACTED]**. In a model, it will be attempted to reproduce the clinical signs that are associated with a certain disease or syndrome. For a potentially new pathogen this will reveal if it is indeed able to induce disease (Koch's postulates). For known pathogens the infection model has to allow assessment of the efficacy of vaccine candidates under controlled laboratory conditions as described in Ph.Eur 5.2.7 (Evaluation of efficacy of veterinary vaccines and immunosera) or vaccine specific monographs, EU Directive 2001/82/EC, including amendments (Community code relating to veterinary medicinal products), 9CFR (Code of Federal Regulations, animals and animal products) and national guidelines and regulations outside the EU; see also 'Ad 2) vaccination studies' described below. It can be noted that during the research phase the aim is to design a challenge model which will give sufficient likelihood of obtaining statistically significant clinical results upon infection. To develop such a model a minimum number of animals will be used, which depends on the clinical signs that can be induced. These numbers can therefore be lower than indicated in the regulations.

Improvement or refinement of existing models will be undertaken for testing of new serotypes / pathotypes or in case not all disease characteristics that are relevant for the field situation are presented in the model, or if the model shows a high variability in the level of infection/pathology within a group of infected animals.

Infection studies are furthermore performed when a pathogen has been modified by targeted gene modification or by *in vitro* passaging or chemical modification: these alterations are made to study specific genes of the pathogen in the pathogenicity and interaction with the host's immune system or to attenuate the pathogen in order to generate a live attenuated vaccine candidate.

Studies to investigate the pathogenicity and / or to develop or improve an infection model will have the following set-up:

- Administration of a (potential) pathogen
- Observation of clinical signs post infection/sampling (e.g. for shedding of the pathogen, immune responses against the pathogen)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes and harvesting of organs.

The degree of discomfort will depend on the nature of the pathogen involved as the infection model is supposed to mimic the natural disease as much as possible as well as the (cumulative) nature of the procedures involved.

Ad 2) Safety and efficacy studies

Once an infection model has been established and vaccine candidates have been identified, the safety and efficacy of the candidate vaccines against a pathogen can be evaluated. When looking into the options for vaccination against a newly discovered pathogen or a pathogen for which no vaccine is available, the vaccine candidate(s) to be tested are based on the scientific literature and the knowledge within **10.2.e.en.g** on pathological processes, immune mechanisms and vaccines against related pathogens to have the highest chance of success and thereby minimize the number of animals needed. This will determine whether a live or inactivated vaccine approach will be taken. In some instances, there will be collaboration with outside partners (e.g. universities) that have specific knowledge on a (new) pathogen and that might even already have prepared and tested vaccine candidates. In addition, research on new (combination) vaccines for pathogens that are already being controlled by vaccination will also be guided by the experience gained under field conditions with the marketed product(s). An inactivated vaccine can be a whole killed microorganism or virus, or an immunogenic part of the pathogen (subunit vaccine). **10.1.c.en.10.2.g**

10.1.c.en.10.2.g. An inactivated vaccine will be formulated with an adjuvant that is expected to be safe in the target animals (chickens). A live vaccine is an attenuated form of the pathogen that has been prepared by "classical methods", such as cell culture passage or chemical mutagenesis, or by targeted gene modifications with the help of recombinant-DNA techniques. Another form of live vaccines, are so called **10.1.c.en.10.2.g** vaccines that consist of either or non-pathogenic microorganisms or an attenuated pathogen that **10.1.c.en.10.2.g**. A live vaccine candidate will be characterized and tested for purity before the start of studies in animals.

In cases where there is already a commercial vaccine available, an additional test group can be included with this commercial vaccine for comparison.

In vaccination-challenge studies using the infection model, it will be evaluated whether the vaccine candidate can provide the required (improved) protection against the pathogen in terms of reduction of infection, clinical signs and (histo)pathology. Only if a vaccine candidate gives promising results (i.e. (statistically significantly) reduces one or more aspects of a disease) it is considered for the development phase. By studying the immune response after vaccination, it will be attempted to find a correlation between the height of the immune response (e.g. as measured in an in vitro serological test) and protection in the target animal (chicken). In those instances where such a correlation can be established, candidate vaccines can be tested on the basis of that antibody response instead of by challenge infection. However, although some vaccines are able to protect against the disease in question, the immune response measured (if any) is not always indicative of the level of protection, especially in case protective antigen(s) are unknown. If no correlate of protection is available, vaccine efficacy can only be evaluated in vaccination-challenge studies.

In order to make a proper risk-benefit analysis for a new product, all vaccines have to be tested in safety studies in the target animal (Ph.Eur 5.2.6 (Evaluation of safety of veterinary vaccines and immunosera), EU Directive 2001/82/EC and amendments (Community code relating to veterinary medicinal products), VICH guidelines and national guidelines and regulations) and 9CFR (Code of Federal Regulations, animals and animal products). It can be noted that during the research phase a minimum numbers of animals will be used per group which will depend on the clinical signs induced with the aim to design a challenge model which will give sufficient likelihood of obtaining a statistically significant clinical result in the infected group and these number can therefore be lower than indicated in the regulations.

Inactivated and subunit vaccines usually contain an adjuvant that enhances the immune response to the antigen(s) in the vaccine. Unfortunately, although the adjuvant preparations themselves can be considered safe, the combination of antigen and adjuvant sometimes results in unwanted systemic and/or local reactions after vaccination. Therefore, for each new inactivated or subunit vaccine the effect on the animals' general health, determined by observing clinical signs and injection site reactions has to be determined. For an attenuated live vaccine, it has to be shown that it is unable to induce disease. Therefore, live vaccine candidates will be evaluated for their lack of virulence in the infection model.

Testing specific gene-deleted mutants in the infection model will also provide knowledge on which antigens are required for pathology and/or survival within the host. These antigens can then be considered for an inactivated vaccine approach.

As evaluation of the safety and efficacy of vaccination will be combined in the research phase, studies will be performed according to the following basic set-up (infection will not be performed in case an immunological marker for protection can be applied):

- Administration of the candidate vaccine
- Observation of clinical signs post vaccination
- Monitoring responses (e.g. blood sampling)/persistence (e.g. shedding) in case of a live vaccine
- Infection with a pathogen (field isolate)
- Observation of clinical signs post infection/sampling (e.g. for shedding of the pathogen)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes and harvesting of organs.

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care. The one area in which a moderate to severe degree of suffering may occur is after the onset of clinical disease following infection.

Ad 3) Assay development and preparation of biomaterials

Biomaterials such as specific antisera or monoclonal antibodies are needed in most vaccine projects for different purposes such as the identification (e.g. by immunohistochemistry), characterisation and quantification of the vaccine strain, discrimination between different strains (e.g. serotyping), neutralization of the vaccine virus and also for the design of *in vitro* tests.

For each new vaccine, batch tests for the quantification and identification of the active ingredients are required under EU Directive 2001/82/EC and amendments (Community code relating to veterinary medicinal products), Ph.Eur 0062 (Vaccines for veterinary use) and 9CFR (Code of Federal Regulations, animals and animal products) regulation to verify the consistency of the manufacturing process and the final product. Preferably, *in vitro* tests are used for batch testing, but in case an *in vitro* batch test is not possible for a new vaccine, a serological assay in laboratory animals will have to be set up.

Furthermore, challenge materials (as biomaterial) are needed in vaccine projects for infections, efficacy and in few cases safety studies. In most cases these can be prepared *in vitro* but this is not always possible; e.g. for the preparation of challenge material of Marek's disease virus, Infectious Bursal disease virus, and *Eimeria* spp. parasites animal are needed.

Immunization experiments of laboratory animals will generally be as follows:

- Administration of antigen/pathogen
- Collection of blood (or faecal excretions in case of *Eimeria* parasites)

In case of potency tests that involve challenge infection, the following additional treatments are employed

- Administration of challenge inoculum
- Clinical observation

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.

At 10.2 e. eng, all R&D projects are subject to regular 10.2 e. eng. Only research projects that provide a (medical) need, have a reasonable market expectation and probability of success will get approval to start the research phase.

At the start of a research project, the project team agrees on the types of studies to be performed and the requirements for the studies.

The type of experiments and go / no-go decision points in a research vaccine project *for the development new pathogens or variants of known pathogens* are the following. The next step will only be taken when the previous steps have been successful.

1. The appearance of new strains of a particular pathogen or a new pathogen is often difficult to detect, and can rely on anecdotal reports from veterinarians and animal owners. Field isolates might therefore have to be studied (both *in vitro* and *in vivo*). These studies are performed to investigate the pathogenicity of an agent (pathogen) and the immune response induced by the agent. If a potential new pathogen fails to fulfil Koch's postulates, the vaccine research project will be stopped (go / no go).
2. In the next step, infection studies with field isolates are performed to develop or improve an infection model. An infection model is required for vaccine development (see step 4 below: Vaccination challenge studies). Reasons for having to improve an existing model could be that the model is "too artificial" and does not mimic the natural disease adequately or because there is too much animal - to - animal variation in the results. If no infection model can be established

- the project may be stopped (go / no go).
3. Infection studies are also required to study the pathogenicity and interaction with the host's immune system or to determine whether a strain is sufficiently attenuated to serve as vaccine strain. On the basis of the study results, it will be determined if a live vaccine candidate has an acceptable risk-benefit profile. Some fine-tuning of the composition (e.g. changes in dose or application route) may be necessary before the optimal vaccine has been reached (proof of concept). If proof of concept cannot be obtained the research project will be stopped (go / no go).
 4. In the final stage safety and efficacy studies are performed with the candidate vaccine strains. These studies can only be performed once an infection model (see step 2 above) is available and vaccine candidates have been identified (see step 3 above). Orienting vaccination challenge studies are performed to get a first impression about the safety and efficacy of the vaccine candidates. Several studies may be needed to test a number of vaccine candidates in order to find a candidate vaccine that meets the requirements. If, with the knowledge available, it is impossible to produce a candidate vaccine that fulfils the criteria for safety and efficacy, further development is stopped (go/no go).

The type of experiments and go / no-go decision points in a research vaccine project *for the improvement of existing vaccines* are the following:

In the case of improvement of existing vaccines, an infection model already exists and steps 1 and 2 as described above can be omitted. Updated vaccine candidates are further tested as described above in step 3 and step 4. Any vaccine update that does not result in a better safety and efficacy profile than the current vaccine is not further developed (go / no go).

Studies in laboratory animals for assay development and preparation of biomaterials.

These studies can be initiated in parallel with studies mentioned above, but they will only be undertaken if the immunological reagents or vaccine or challenge materials are required for further research, and not (commercially) available.

During the regular (10.1 c en 10.2 g) project reviews by the 10.2 .e. en g the outcome of the studies is assessed against the requirements and pre-set milestones as well as go/no-go decision points are evaluated. Typical go/no go decision points are described above; results of infection studies (can a model be developed to study potential vaccine candidates for efficacy) and safety and efficacy studies (vaccine needs to be safe and efficacious and comply with regulatory requirements). When the project involves a change in the production process a typical go/no go point could be whether safety and efficacy have not been negatively affected by the proposed change. Other go/no go decisions will depend on the anticipated product profile.

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	Research: infection studies in chickens and non-target animals
2	Research: safety and efficacy studies in chickens
3	Research: Preparation of biomaterials and assay development
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **10.2 .e. en g** 20174004-10
 2. Titel van het project: **Research of new poultry vaccines**
 3. Titel van de NTS: **Onderzoek naar nieuwe vaccins tegen ziekten bij kippen**
 4. Type aanvraag: wijziging **projectvergunning**
 5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **10.2 .e. en g**
 - telefoonnummer contactpersoon: **10.2 .e. en g**
 - e-mailadres contactpersoon: **10.2 .e. en g**
 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - X ontvangen door DEC: 16-06-2020
 - X aanvraag compleet: ja
 - in vergadering besproken
 - X anderszins behandeld per e-mail
 - X termijnonderbreking(en) van 26-06-2020 tot 01-07-2020
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - X advies aan CCD: 06-07-2020
 7. **De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze heeft de instemming van de IvD.**
- Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.*
8. Eventueel horen van aanvrager nvt
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
 9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum 26-06-2020
 - Gestelde vraag/vragen zie onder
 - Datum antwoord 01-07-2020
 - Verstrekt(e) antwoord(en)

In blauw de vragen vanuit de DEC over het projectvoorstel "Research of new poultry vaccines". In rood de reactie van de aanvrager, grijs gearceerd de aanpassingen in de aanvraag.

Beslissing

1. Bij safety studies wilt u 10.1 c en 10.2 g inzetten, vogels die zich op de grond begeven en die veelal gehouden worden. Omdat een deel van de kippen tegenwoordig vrije uitloop heeft, vragen wij waarom er geen onderzoek nodig is met wilde vogels.

Reactie: Een aantal aspecten vormen de grondslag voor de keuzes die gemaakt zijn voor de opzet van deze studies in non-target vogelsoorten:

1) *De beschreven veiligheidsstudies kunnen het best worden omschreven als pathogeniciteitsstudies die een initiële evaluatie van de veiligheid van een kandidaat vector vaccin bieden; in deze studies wordt de kandidaat vector vaccin direct toegediend aan de non-target vogelsoorten. Pas in een later fase van de ontwikkeling (welke in de development aanvraag zijn omschreven) zal de spreiding worden onderzocht, d.w.z. spreiding van kip naar in-contact dieren.*

2) *De keuze voor deze vogelsoorten is tevens gemaakt omdat het houden van wilde vogels grotere risico's met zich meebrengt vanwege al aanwezige ziekten. De vogelsoorten beschreven kunnen worden verkregen van commerciële houderijen waar normaliter een ziektegeschiedenis van de ouderdieren beschikbaar is. Tevens zijn criteria voor huisvesting van wilde vogelsoorten niet opgenomen in directive 2010/63/EU en zal dit per soort eerst onderzocht moeten worden om zo de integriteit en kwaliteit van de studie te kunnen waarborgen.*

Op basis van punt 1 t/m 2 is de tekst onder DAP1 sectie B als volgt aangepast:

10.1 c en 10.2 g are selected for initial pathogenicity evaluation of a vaccine (10.1 c en 10.2 g) candidate as these can come in contact with chickens or they are the original host species".

Belangrijk is om aan te geven dat deze initiële studies in non-target vogelsoorten zal resulteren in een go/no-go beslissing alvorens het verder wordt doorontwikkeld als 10.1 c en 10.2 g vaccine, dit is toegevoegd aan sectie 3.1 van het onderzoeksvoorstel:

"The outcome of these initial efficacy and safety studies will result in a go/no-go decision for further development of a new vaccine platform".

2. Kunt u aangeven waarom bij deze studies het aantal controledieren even hoog moet zijn als het aantal dieren in de gevaccineerde groep?

Reactie: De groepsgrootte is het minimaal benodigde om de wetenschappelijke integriteit van de studie te kunnen waarborgen en wordt beargumenteerd in ieder studie protocol wat geëvalueerd wordt door de animal welfare body. De controlegroep is van belang om potentiële niet-vaccine (10.1 c en 10.2 g)-relateerde klinische symptomen te kunnen beoordelen, met name wanneer dieren worden gebruikt waar de baseline klinische symptomen en uitval variabel kan zijn dan in beter gekarakteriseerde target-diermodellen; in deze gevallen kan het nodig zijn om meer dan 5 dieren te gebruiken. De volgende tekst is opgenomen:

"Group size will be 5 – 10 animals per group and up to three different doses of the new 10.1 c en 10.2 g vaccine will be used for inoculation; uninfected animals will be included as controls (1 group; 5 -10 animals per group). Studies will adhere to the minimum group size needed to ensure the scientific integrity of the study and will be evaluated by the animal welfare body. The control group enables interpretation of potential non-vaccine (10.1 c en 10.2 g) clinical symptoms, which is particularly important under conditions where clinical symptoms and drop-out rates can be more variable than in better characterised target animal models. Eighty (80) animals from each species (2 – 3 studies) are expected".

3. Het valt de DEC op dat de groepsgroottes soms oplopen tot 40 dieren per groep. Kunt u meer informatie geven over het belang van de parameters waar u een kleine effect size verwacht? Specifiek de informatie die de DEC zou waarderen: kunt u iets meer achtergrond geven bij de berekening (design, statistische test, poweranalyse) en kunt u uitleggen waarom deze kleine effect size toch relevant is voor u?

Reactie: De groepsgrootte voor het grootste deel van de studies onder deze vergunning zal tussen de 5 en 20 kippen per groep liggen. In een klein deel van de

studies zullen verschillen in eiproductie en -kwaliteit worden onderzocht. Bij leghennen of vleeskuikenbroederijen heeft een daling van de eiproductie (d.w.z. het percentage kippen dat per dag een ei legt) van 10% (of nog minder) een grote economische impact. In de beoogde studies wordt getracht dit percentage te benaderen (opzet van het challenge model onder Appendix 1 en in vaccine effectiviteitsstudies onder Appendix 2) om de veldsituatie zorgvuldig na te bootsen. Ter referentie, om een daling in eiproductie van 10% te kunnen evalueren met 80% power bij een 95% betrouwbaarheidsinterval zijn 42 kippen nodig (sample size berekening in NQuery software). In de praktijk worden hiervoor t.b.v. de statistische analyse, 40 kippen verdeeld over replica's, bijvoorbeeld 4 groepen van 10 kippen per groep. Om de effecten van vaccinatie te bestuderen wordt gebruik gemaakt van 2x2 kruistabellen (χ^2 toets). Ter referentie, voor ziekteverwerkers waarvoor internationale richtlijnen beschikbaar zijn voor de evaluatie van vaccines, bijvoorbeeld voor Egg Drop Syndrome Virus and Infectious Bronchitis Virus, worden minimaal 30 kippen per groep voorgeschreven in challenge modellen om eiproductie en -kwaliteit te analyseren. In deze modellen zijn voor sommige virulente challenge stammen 30 dieren al voldoende omdat deze ziekten een afname van meer dan 10% geven. Echter voor een ziekte zoals Avian metapneumovirus wordt een afname van ongeveer 10 % verwacht en is een groepsgrootte van 40 gewenst. Het kan verder opgemerkt worden dat het ongerief voor de onbeschermdede controle groep erg laag is in deze studies omdat behalve de reductie in ei-leg er geen of heel lichte klinische symptomen zijn. Een korte toelichting is hiervoor opgenomen in Appendix 1 en Appendix 2:

"An exception to this will be studies to establish challenge models for pathogens (e.g. Infectious Bronchitis virus, Egg Drop Syndrome virus, Avian metapneumovirus) for which relatively small changes in clinical outcome parameters are to be expected, e.g. egg production and/or egg shell quality for which changes of 10% are expected in the models used".

"To enable statistical analysis of these parameters, group sizes of up to 40 animals may be required. For example, based on these criteria, a study design of 40 birds allocated to subgroups (e.g. four subgroups of 10 birds each) provides a sufficient likelihood to demonstrate a statistically significant drop in egg production of 10% using contingency tables. For reference, international guidelines (European Pharmacopeia) for Egg Drop Syndrome virus and Infectious Bronchitis virus describe a minimum of 30 birds per group to evaluate vaccine efficacy against a drop in eggproduction".

4. Verder wil de DEC u de overweging geven de NTS nog eens na te lopen en daar de stijging van het aantal dieren kort toe te lichten.

Reactie: In sectie 3.3 in de NTS is een korte toelichting toegevoegd:

"Gedurende de looptijd van dit project (juni 2020) heeft een tussentijdse evaluatie plaatsgevonden en is op basis van de toegenomen onderzoeksactiviteiten het totaal te verwachten diergebruik verhoogd".

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag voor deze wijziging (10).

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) er is geen advies gevraagd aan experts, die geen lid zijn van de DEC. n.v.t.

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling) van wijziging 10

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Ja
2. De aanvraag betreft een wijziging.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? Ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Er zijn geen DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

Eén van hoofdredenen voor deze wijziging is een aanpassing in de R&D-structuur binnen de organisatie van de vergunninghouder. In de periode [redacted] 10.2 .e. en g is de [redacted] 10.2 .e. en g overgeplaatst naar Nederland; deze verandering was ten tijde van de oorspronkelijke vergunningaanvraag niet bekend. Hierdoor is het onderzoeksteam gegroeid en zijn projecten uit het [redacted] 10.2 .e. en g voortgezet bij deze Nederlandse vergunninghouder. Op basis van het diergebruik tot dusver (waaronder tevens activiteiten op projecten die oorspronkelijk in [redacted] 10.2 .e. en g liepen), en te verwachten/gepland onderzoek voor de verdere looptijd van de vergunning, is beoogd de vergunning aan te passen aan de nieuwe situatie en te verfijnen op basis van de huidige inzichten. De aantallen dieren die onder de drie bijlagen vallen zijn zorgvuldig bekeken en omvatten een verlaging op een aantal onderdelen (aangezien het gebruik lager blijkt te zijn) en een verhoging op twee onderdelen (als gevolg van de overgeplaatste onderzoeksactiviteiten), dit zijn "safety and efficacy"-studies voor virale pathogenen onder bijlage 2 en het genereren van biomaterialen (hoofdzakelijk [redacted] 10.2 .e. en g onder bijlage 3. De toename in bijlage 2 gaat gepaard met een verlaging van de aantallen in de hogere ongeriefklassen. De beoogde aanpassingen in dit wijzigingsvoorstel omvatten een verhoging van 21.200 naar 25.250 kippen.

De tweede voorgestelde aanpassing betreft de uitbreiding van onderzoek voor de ontwikkeling van [redacted] 10.1 c en 10.2 g. Het gebruik van [redacted] 10.1 c en 10.2 g kan de hoeveelheid vaccinaties in kippen reduceren (een [redacted] 10.1 c en 10.2 g kan bescherming geven tegen meerdere ziekten) en kan het vaccinatieprogramma verder vereenvoudigen indien deze [redacted] 10.1 c en 10.2 g gecombineerd kunnen worden met andere vaccinaties. Op deze wijze kan het dierwelzijn verhoogd worden door minder vaccinatiemomenten en goede bescherming tegen ziekten.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet). Voor zover bekend bij de DEC zijn er geen aspecten in de aanvraag die niet in overeenstemming zijn met andere wet- en regelgeving.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).
Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*).
Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.
6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.
Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*). De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en infrastructuur beschikt om de doelstelling van het onderzoek binnen de gevraagde termijn te realiseren. Dit wordt ondersteund door het feit dat de aanvrager al eerder succesvol vaccins voor pluimvee heeft ontwikkeld en op de markt gebracht. Het onderzoek dat nu vanuit 10.2.e. eng wordt ondergebracht bij de vergunninghouder sluit daar heel goed bij aan.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).
De voorgestelde wijziging past bij de eerder gekozen strategie, waardoor ook deze in de voorgestelde wijziging de experimentele aanpak zal bijdragen aan het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) deels aankoop van (commerciële) leverancier.
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)

- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

Er is sprake van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Voor onderzoek naar werkzaamheid en veiligheid van diergeneesmiddelen, waaronder de vaccins vallen, is onderzoek in het uiteindelijke doeldier, en in diersoorten die in de praktijk in aanraking zouden kunnen komen met de gevaccineerde dieren, uiteindelijk wettelijk verplicht. Het ligt dan voor de hand om ook in de research-fase dezelfde dieren te gebruiken. Gezien het doeldier, is het dan niet ongebruikelijk daarvoor dieren aan te kopen die niet speciaal voor dierproeven zijn gefokt. Over het gebruik van bepaalde dieren zijn aanvullende vragen gesteld, welk naar tevredenheid zijn beantwoord.

- 10.** Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De te gebruiken dieren worden in principe gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen gesteld in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU. In een aantal gevallen is huisvesting in isolatoren noodzakelijk om overdracht van ziekteverwekkers op andere dieren te voorkomen. In dat geval geldt volgens de aanvrager het volgende: "In case animals need to be housed in isolators the exemption given in the directive 2010/63/EU, annex III, in the section on domestic fowl is applicable and "birds can be housed in smaller enclosures containing appropriate enrichment with a minimum floor area of 0,75 m²". Dit komt overeen met wat in dit type onderzoek gebruikelijk is en is voldoende onderbouwd.
- 11.** Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). Het ongerief van de dierproeven is bijgesteld op basis van de huidige inzichten (zie vragen en antwoorden), en is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor het grootste deel van de dieren in de studies (opwekken immuniteit) en afnemen materialen voor assay-ontwikkeling zijn licht of matig. Ook de studies waarin de werkzaamheid wordt onderzocht door een challenge met de ziekteverwekker veroorzaken licht of matig ongerief. In bepaalde gevallen wordt niet de natuurlijke weg van infectie gekozen, maar één waarvan men door de jarenlange ervaring zeker dat de ziekte zich gaat ontwikkelen, of kan een middel worden gebruikt om de weerstand (tijdelijk) te verlagen. Het uiteindelijk ongerief wordt vooral bepaald door de bekende procedures die deel uitmaken van deze experimenten: toediening van het vaccin, monsternames, toediening van de ziekteverwekker en observatie van symptomen. In een kleiner deel van de gevallen is het nodig om de dieren in het kader van werkzaamheidsstudies te 'challengen' met ziekteverwekkers die ernstige ziekteverschijnselen kunnen veroorzaken. Daarbij dient te worden aangetekend dat veel van de dieren die met deze ziekteverwekkers worden 'gechallenged' beschermd zullen zijn door het te testen vaccin. Een ernstige aantasting van het welzijn zal zich naar verwachting voordoen in onbeschermdoedieren of dieren die door een lage dosis van het vaccin niet volledig beschermd zijn. Ook in sommige veiligheidsstudies kunnen challenges zijn opgenomen in de richtlijnen voor uitvoering. Die kunnen eveneens ernstig ongerief veroorzaken (totaal maximaal 15% van het totale aantal dieren in de aanvraag). De aard van deze verschijnselen is voor alle gangbare ziekteverwekkers bekend en in de loop van vele jaren zijn bij ^{10.2.e. en g} in nauwe samenspraak tussen onderzoekers, dierenartsen, proefdierdeskundigen/IvD en de DEC strikte criteria voor humane eindpunten ontwikkeld. Voor alle dieren in de projectaanvraag geldt dat navolgbaar is in welk soort experiment zij zullen worden ingezet, welke handelingen ze zullen ondergaan en welke gevolgen dat heeft voor hun

welzijn.

- 12.** Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*). Elke dierproef vormt, door de vrijheidsbeperking en de aantasting van de lichamelijke integriteit voor instrumentele doeleinden, een aantasting van de integriteit van het dier. Het toedienen van vaccins, het afnemen van bloed en het toedienen van ziekteverwekkers en de gevolgen daarvan, kunnen natuurlijk beschouwd worden als een aantasting van de integriteit van de dieren, maar de DEC is van oordeel dat bij deze handelingen het ongerief (de welzijnsaantasting) op de voorgrond staat. De aantasting van de integriteit van de dieren is daarmee vergeleken beperkt. Dit is niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.
- 13.** Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). De aard van de ziekteverschijnselen is voor alle gangbare ziekteverwekkers bekend en in de loop van vele jaren zijn bij vergunninghouder in nauwe samenspraak tussen onderzoekers, proefdierdeskundigen/IvD en de DEC strikte criteria voor humane eindpunten ontwikkeld. Voor elk werkprotocol worden de humane eindpunten en de eindverantwoordelijkheid voor het toepassen daarvan, tot in detail afgestemd met de IvD. Bij onduidelijkheid of verschil van inzicht over de criteria in concrete situaties geeft het oordeel van de op dat moment verantwoordelijke dierenarts de doorslag. Dit is niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.

3V's

- 14.** Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Het pluimvee, meestal kippen, is in veel van de experimenten zowel proefdier als doeldier. Bovendien hebben de voorgestelde experimenten een sterk routinematig karakter en is het design van de experimenten in veel gevallen standaard in de ontwikkelingsfase. Voor de huidige doelstelling, de uiteindelijke ontwikkeling van de vaccins, is er geen geaccepteerd vervangingsalternatief voor deze experimenten. Daar waar mogelijk wordt al gebruik gemaakt van in vitro experimenten. Dit is niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.
- 15.** Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). Het aantal benodigde dieren in de experimenten zal op basis van een statistische berekening worden bepaald of op basis van benodigd hoeveelheid materiaal. De aanvrager heeft op basis van recente ervaring met dit soort experimenten een realistische inschatting gemaakt van het totaal aantal te gebruiken dieren. De aantallen dieren per groep en in totaal zijn bijgesteld en goed onderbouwd. Zie ook de vragen en antwoorden.
- 16.** Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.
- 17.** Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over

voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

- 18.** Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).
Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.
- 19.** Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
Niet gewijzigd t.o.v. de oorspronkelijke aanvraag.
- 20.** Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. N.v.t.

NTS

- 21.** Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en is duidelijk geformuleerd. Zie ook vraag 4 van de DEC.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).
Rechtvaardigt het belang van onderzoek naar nieuwe vaccins voor ziekten bij kippen het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan, ook met de voorgestelde wijziging?
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoetgekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).
Voor het merendeel van de dieren (85%) die gebruikt worden in de voorgestelde experimenten leiden de experimenten tot licht of matig ongerief en een beperkte aantasting van hun integriteit. Met name als de werkzaamheid van de vaccins wordt getest kan dit voor een deel van de dieren (15% van het totaal) leiden tot ernstig ongerief, omdat in de 'challenge'-proeven niet-gevaccineerde controlegroepen worden gebruikt. De onderzoekers doen deze 'challenge' proeven slechts als er geen geaccepteerd alternatief voorhanden is. De duur en de ernst van het ongerief worden

door de onderzoekers zoveel mogelijk beperkt.

Daar staat tegenover dat het ontwikkelen van nieuwe of verbeterde vaccins tegen infectieziekten bij kippen zal bijdragen aan het verminderen van de kans op het uitbreken van infectieziekten in pluimvee. Dit bespaart grote aantallen dieren veel leed. De aanvrager heeft een groot economisch belang bij het op de markt kunnen brengen van de te testen vaccins en kan dit alleen doen als hij door middel van de voorgestelde dierproeven kandidaat vaccins kan testen om uiteindelijk in de development fase verder te kunnen testen. De houders en eigenaren van de dieren hebben uiteindelijk eveneens een groot economisch belang bij het beschikbaar komen van goede en zo goedkoop mogelijke vaccins. Bij een ziekte-uitbraak op hun bedrijf leiden ze grote economische schade. Als zij hun dieren kunnen beschermen verbetert dat hun concurrentiepositie. Ook hebben veehouders vanuit hun zorg voor de dieren belang bij het beschikbaar komen van goede vaccins. Ziekte-uitbraken bij pluimvee kunnen in een samenleving waarin het houden van pluimvee voor de productie van vlees en eieren een grootschalige economische activiteit is, tot ernstige ontwrichting van die samenleving leiden en voor grote economische schade zorgen, ook buiten de pluimveehouderij. Het kunnen beschikken over goede vaccins is een substantieel belang. De aanvrager draagt daaraan bij. Tot slot kunnen nieuwe vaccins bijdragen aan een beperking van het gebruik van antibiotica in de pluimveehouderij en, voor zover de vaccins bescherming bieden tegen zoonoses, beschermen ze ook mensen tegen het oplopen van zoonoses. Het medisch en maatschappelijk belang daarvan is groot.

De DEC acht de economische belangen van de aanvrager en van de dierhouders op zich legitiem en zij leggen zeker enig gewicht in de schaal, maar alleen in combinatie met het grote maatschappelijke belang en de voordelen voor de doeldieren, namelijk betere vaccins en minder vaccinatiemomenten, rechtvaardigen ze het gebruik van de dieren in de experimenten.

De aanvrager heeft goed onderbouwd dat binnen het concern het onderzoek waaronder dierexperimenten welke eerst gepland waren om in 10.1 c en 10.2 g^{3. en 9} uit te voeren nu in Nederland zouden moeten worden uitgevoerd. De ethische afweging is daardoor niet veranderd.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld). De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen beschreven in het projectvoorstel "Research of new poultry vaccines". Volgens de DEC wegen de voordelen voor de doeldieren, de samenleving, de aanvrager en de houders van de dieren zwaarder dan de nadelen voor de gebruikte proefdieren. Het project is goed opgezet. Verder is de DEC van mening dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en dat de aanvrager ervoor zal zorgen dat het ongerief van de proefdieren zoveel mogelijk beperkt zal worden. Gelet op het bovenstaande is de DEC unaniem van oordeel dat het belang van de doelstelling van het project "Research of new poultry vaccines" het gebruik en het ongerief van de proefdieren rechtvaardigt.

De ethische afweging is door de toegevoegde wijzigingen niet veranderd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

- x De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - x Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*). Het advies is unaniem tot stand gekomen.
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Buiten de context stelt de DEC het dilemma vast dat grote dierziekte-uitbraken in de hand worden gewerkt door de intensieve manier waarop kippen worden gehouden: zeer grote aantallen dicht bij elkaar. In de huidige pluimveehouderij kan dit onderzoek, inclusief de wijziging, een positieve bijdragen leveren aan allerlei waarden, inclusief het welzijn van de kippen in die houderij. Inmiddels heeft de CCD, naar aanleiding van een advies van de RDA, de eisen aan de toetsing van onderzoek ten behoeve van de intensieve dierhouderij aangescherpt. Het gaat in dit geval echter om een wijziging op een vergunning die eerder verleend is. Om die reden heeft de DEC deze verscherpte afweging niet uitgevoerd en laat zij open wat daarvan de uitkomst zou zijn geweest.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2 .e. en g

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD 10.2 .e. en g 20174004-10

Bijlagen

3

Datum 14 augustus 2020
Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2 .e. en g

Op 16 juni 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Research of new poultry vaccines" met aanvraagnummer AVD 10.2 .e. en g 20174004-10. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf 14 augustus 2020 is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de vergunning, die is afgegeven van 19 februari 2018 tot en met 18 februari 2023.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 10.2 .e. en g (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 7 juli 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Datum:

14 augustus 2020

Aanvraagnummer:

AVD 20174004-10

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 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 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

14 augustus 2020

Aanvraagnummer:

AV 152 2 20 020174004-10

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

i.o.

A black rectangular redaction box covering the signature area. The text '10.2.e. en g' is visible through the redaction in a light, semi-transparent font.

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

10.2 .e. en g

10.2 .e. en g

deze wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 19 februari 2018 tot en met 18 februari 2023, voor het project "Research of new poultry vaccines" met aanvraagnummer AVD^{10.2 .e. en g} 20174004-10, na advies van dierexperimentencommissie 10.2 .e. en g

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2 .e. en g

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 16 juni 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 16 juni 2020;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Research: infection studies in chickens, zoals ontvangen op 16 juni 2020;
 - 3.4.4.2 Research: safety and efficacy studies in chickens, zoals ontvangen op 16 juni 2020;
 - 3.4.4.3 Research: Preparation of biomaterials and assay development, zoals ontvangen op 16 juni 2020;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 16 juni 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 7 juli 2020.

Aanvraagnummer:

AVD 20174004-10

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Research: infection studies in chickens			
	Kippen	7.200 / 4200	31,0% Ernstig 50,0% Matig 19,0% Licht
	<i>Andere vogels (80 kwartels; 80 fazanten; 80 eenden)</i>	240	25,0% Matig 75,0% Licht
	<i>Andere vogels (Kalkoenen)</i>	80	100,0% Licht
3.4.4.2 Research: safety and efficacy studies in chickens			
	Kippen	11.600 / 19200	18,0% Ernstig 38,0% Matig 44,0% Licht
3.4.4.3 Research: Preparation of biomaterials and assay development			
	Kippen	2.400 / 2050	3,3% Ernstig 7,8% Matig 88,9% Licht
	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	50	Licht
	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	50	Licht

Voorwaarden*Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.

Aanvraagnummer:

AVD ¹⁰² ⁰¹⁶ 20174004-10

- 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:

AVD 20174004-10

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

Aanvraagnummer:AVD  20174004-10

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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, eerste lid onder d en derde lid 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.



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for 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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2 .e. eng

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2 .e. eng

- 1.3 Provide the title of the project.

In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

Basic research

Translational or applied research

Regulatory use or routine production

Research into environmental protection in the interest of human or

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.

(Adjustments are printed in red and green. The letter accompanying this application provides

detailed additional background information on these adjustments.)

Introduction:

To ensure the safety of humans, animals and the environment after exposure to industrial chemicals, pharmaceuticals, plant protection products, biocides, implantable medical devices, vaccines and food/feed (further referred to as 'substances'), national and international legislation requires (inter-)national authorities to assess information on safe manufacture and use of substances. National and international legal and scientific bodies / committees determine which information is needed to declare a product as being 'safe' or with a known acceptable risk. Most of this information is obtained via mandatory in-vivo safety assessment studies (further in this project referred to as 'toxicological studies') when no authority-approved in-vitro or ex-vivo alternative testing methods are available.

For pharmacological substances and vaccines, prior to the registration of product, data from pharmacokinetics and in-vivo ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion) studies will be required for further development of the compound.

The in-vivo studies in this project comply to the following requirements:

- Legal requirements for animal toxicological research as described in (inter-)national Laws and Regulations;
- Technical Guidelines to define a framework in which the technical, scientific and quality standards are guaranteed and secured for in vivo testing.

Background:

10.2.e.eng [REDACTED]

[REDACTED] scientists have a broad experience in different aspects of the pharmaceutical and chemical development processes and are therefore able to provide clients with expert advice on the studies required and the design, execution and interpretation of such studies. They are also able to provide expert advice at key decision points of drug discovery and development, and chemical registration processes.

Clients require toxicological studies in order to ensure safety, and in case of pharmaceuticals / vaccines, to ensure efficacy as well. The information derived from these experiments are used to 10.2.e.eng [REDACTED] candidates from further development, to remove 10.2.e.eng [REDACTED] from the market (e.g. substances currently in use by patients or public), or from the environment where based on toxicological data, these substances have to be considered to pose an unacceptable risk by the relevant authorities.

The in-vivo studies in this project are part of human, animal and/or environmental safety research programs. This research is required by several national and international authorities such as the European Medicines Agency and US Food and Drug Administration, for substances and products intended for medical, veterinary or other use as consumption. These studies facilitate regulatory decisions, since the data generated are used to support risk assessment and the development programs of substances.

National and international guidelines are permanently subject to changes and 10.2.e.eng [REDACTED] assures to make use of the most recently updated guidelines. An extensive list of applicable guidelines for toxicological studies with laboratory animals, covering studies being performed at 10.2.e.eng [REDACTED], are available on the following websites:

- **ICH** (International Conference of Harmonisation);
- **OECD** (Organisation for Economic Co-operation and Development);
- **EC** (European Commission);
- **EMA** (European Medicines Agency);

- **FDA** (Food and Drug Administration);
- **EPA** (United States Environmental Protection Agency);
- **WHO** (World Health Organisation);
- Technical Guidelines as referred to in Appendices 1-4;
- and others.

The relevant (technical) guideline is dependent on the expected route of exposure of the substance to humans / animals / environment, the intended use of the substance (e.g. human pharmaceuticals, veterinary pharmaceuticals, (agro)chemicals, biocides, food ingredients, etc.) and on the above listed legislation. For an in depth understanding, it should be noted that not all guidelines are fixed, in particular, pharmaceutical guidelines provide the possibility to design the study to a specific information request, to specific substance-related properties and to the development phase of the substance. The results of the studies will be included in the dossier which will be evaluated for market registration by the regulatory authorities, for instance for pharmaceuticals in the Common Technical Document (CTD) for FDA authorization, or in the IUCLID (International Uniform Chemical Information Database) dossier for notification of chemicals under the European Chemical Agency (ECHA).

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?

The objective of this project is to authorize rodent and non-rodent (excluding non-human primates) studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of substances, and to assess information on substances during manufacture and use.

When studies are requested in order to meet regulatory requirements, they will be performed in compliance with relevant national and international legislation. The guidance given in the various guidelines is followed in the design of safety evaluation programs and in the design of studies. The technical implementation of these studies are described in the test guidelines. The applicable test guideline depends on the exposure, the intended use of the substance and applicable legislation. The respective test guideline(s) will be listed in the study plan (protocol) of each study.

The program of work defined under this project proposal may take place early in the discovery stage (i.e. pre-clinical candidate selection and refinement), in later stages of development of substances (i.e. pharmacokinetic profiling for dose selection in advance of pivotal safety studies, clinical trials, or kinetic analysis to refine environmental residue models and acceptable intake levels), or for dose level selection purposes, and may therefore start at any point in the development process. Studies are performed to either directly meet the requirements of various regulatory authorities worldwide or as part of a robust supporting strategy used to evaluate research strategies.

In summary, studies under this project proposal will contribute to safe exposure of humans, animals and the environment to a wide range of substances (e.g. chemicals, biocides, plant production products, pharmaceuticals, vaccines, medical products, foods/feeds).

3.3 Relevance

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

The principal benefit of the project is the provision of data to facilitate development and/or regulatory decisions on, for example, clinical trial approval or marketing authorization for substances to which humans, animals and or the environment are/will be exposed. The in vivo studies requested in this project application are 'relevant contributions to safe products' and will support, based on observed toxicity levels, any regulatory and corporate decisions related to market approval and the safe use of the product in society.

The data generated are used to support risk assessment and to continue to facilitate the development of substances, thereby contributing to their safe use. The information derived from these studies may be used to preclude unsuitable candidates from development, to remove unsuitable existing compounds from the market or to prevent unsuitable substances from entering the market once they have been shown to pose an unacceptable risk. The information may also be used to replace existing hazardous substances on the market by less hazardous ones. For these purposes, the use of toxicological information from animal testing is considered socially relevant.

For pharmaceuticals, this ultimately contributes to safe products and innovations, which improve the health and quality of the life of humans and/or animals. For industrial and household chemicals and food/feed (ingredients, additives, etc.), it may inform on their safe handling, transport, use and consumption. For crop protection products, this translates to better targeted products that can safeguard and improve the yields of our food supply or reduce any potential negative impact upon ecosystems and the environment (i.e. including humans and animals). Further, (historical) data may be used as a reference in setting-up alternatives for animal testing.

3.4 Research strategy

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

General strategy to design the study plan:

Before a study is initiated, the 'legal/regulatory need' of the in vivo animal study is evaluated. This will be done at an early stage, preferably during initial contact with the client. The applicability of guidelines, alternative(s) for animal testing and status of the substance (e.g. development or registration phase) and other specific information will be provided by the client. In Section 3.4.2, an overview of the [10.1 c en 10.2 g](#) items to be reviewed will be presented in order to assess the 'legal/regulatory need' of the in vivo animal study.

For each individual study, the design and experimental work plan is documented in a study plan. This is authorized by the Study Director (SD) with respect to the scientific objectives, project compliance and the 3Rs before scientific procedures commence, and is reviewed by the Animal Welfare Body (AWB). All known test substance characteristics (shared by the sponsor) and available background information (from sponsor and public available literature) will be taken into account in the design of the study. Based on the available information and applicable guideline, the most appropriate study design and end-points will be determined.

Studies are designed to obtain a maximum amount of data from the smallest number of animals. In general, the number of animals used for each study is considered to be the minimum needed to meet the aim of the study. In general, only one test substance will be tested under one study plan. However, certain study designs or test substances require a multiple number/combination of test substances, vehicles or routes of administration. If possible, identical studies with different test substances are combined to reduce the number of control groups, thus reducing the number of animals used. Certain study designs or test substances require (guideline driven) inclusion of a positive control group, and/or negative control group and/or reference test substance group. The AWB will be involved in the review of the study plan before the start of the study. The research strategy to be followed will depend on the purpose for use of the substance, and the applicable guidelines.

The selection of the animal species will be determined (inter alia) by:

- Applicable directive(s) / guidelines;
- Intended use of the substance;
- Animal species used in (other) toxicity/safety studies;
- Pharmacodynamic characteristics of the substance;
- In vitro metabolism data of the substance;
- Characteristics of vaccine/medical device.

Need for the study -according the guideline as mentioned in the appendices- will guide to species, number and sex:

Choice of species: In case of the use of genetically modified animals, this requirement should be justified. If multiple rodent/non-rodent species are considered appropriate for the aim of the study, the choice of species will be discussed with the AWB.

Number of animals: In general, the total number of animals used per study is based on the recommendations made in the applicable guidelines, and amongst authorities where commonly accepted group sizes are listed as the "default" number of animals required (for more detailed information, see Appendices 1-4 (Type of Animal Procedures)). Based on the numbers of animals used at [10.2.e.eng] over the last first two (project) couple of years and the anticipated study requests for the remaining 3-year project period coming 5 years, the estimated total number of animals to be used at [10.2.e.eng] (over the 5-year projected period) is given in the table below on the next page. Main driver for the adjusted numbers is the increased market demand for studies with rats and rabbits (largely developmental and reproductive studies) and studies with the clawed frog and fish (environmental studies). Trigger for this increase could be the fact that "Checks on more than 3,800 REACH dossiers have found that 32% for substances at tonnage levels of 1,000tpa and above were found to be non-compliant" (BfR workshop on data quality in registration dossiers, August 2018, Berlin; Communication No 030/2018 of 25 September 2018), warranting additional studies to be performed.

Further, test substance characteristics and available toxicological information will guide to route and dosing. This information will be described in the study plan.

Estimated maximum number of animals over the 5-year projected period	
Mouse	22500
Rat	190000 256000
Hamster	200
Guinea pig	1600
Rabbit	22250 62500
Dog	2600
Cat	750
Minipig	1200
Clawed frog	2750 10800
Fish	22000 30000

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.

Prior to the start of the in vivo study the following (15) items will be evaluated:

- 1) **Substance identity:** a unique identifier ([10.2.e.eng]) for the chemical or biological identity of the test substance is determined at this stage. Physico- and chemical properties may be collected.
- 2) **Intended use of the substance:** co-determines the applicable legislation.
- 3) **Most relevant route of exposure:** of human exposure is generally also used in animal testing. If justified, another less relevant route of exposure may be chosen, e.g. based on technical feasibility / practicality of the testing. In such case, it will be ensured that the study remains valid for its intended use. Sometimes multiple routes of exposure are relevant.
- 4) **Applicable jurisdiction(s):** in most cases the jurisdiction of the European Union, USA and / or Japan will apply. However, other jurisdictions are not considered exempt. Moreover, multiple jurisdictions may apply for the same information requirements. At this stage, the applicable jurisdiction will be determined, most often in consultation with the customer who is requesting the research.
- 5) **Applicable legislation(s):** in most cases the legislation of the European Union, USA and / or Japan will apply. However, no legislation of other countries are considered exempt. At this stage, a general distinction between chemical, pharmaceutical and food/feed legislation is made. The applicable legislation will be determined, most often in consultation with the client who is requesting the research. Updates/changes of these legislations will be regularly checked and implemented.

- 6) **Yearly production or import tonnage:** for chemicals, in the framework of REACH, the yearly production or import tonnage of a substance determines the legal information requirements, including those of toxicology.
- 7) **Stage of product development:** different stages of product development may require different legal information requirements.
- 8) **Legally required study type(s):** different legislation may require different study types or study durations for the same legal information requirement. The type of study or study package is selected from one or more of non-animal (not in this project) and 'animal testing procedures' as described in the Appendices 1-4.
- 9) **Availability of other toxicological or pharmacological information:** additional information can be used to help drafting an optimal study design and may preclude – exact- duplication of studies.
- 10) **Availability of alternatives to animal testing:** for those parts of the regulatory-driven toxicity studies, where authority approved alternatives are available and accepted by the appropriate jurisdiction (e.g., in vitro skin absorption test), these will be used. However, for the vast majority of the regulatory-driven toxicity studies, no authority approved alternatives are available as alternatives for animal testing.
- 11) **Applicable Technical Guideline(s):** by following the applicable Testing Guidelines (TG; e.g., OECD, OPPTS), the required tests are detailed into the standard study design. Each ultimate study design will be an interpretation of the TG and may vary with respect to animal number and use, also depending on the applicability of points 12-15 raised below. Updates in the TG will be checked regularly, implemented and referred to in the study plan.
- 12) **10.1 c en 10.2 g** Sometimes study designs are limited to only a part of the Technical Guideline, for example, when specific research into **10.1 c en 10.2 g** toxicity or mechanisms of toxicity is required. Usually these studies are supplementary to existing toxicity information, but are critical for the registration dossier.
- 13) **Laboratory animal species/strain:** The most relevant or most informative animal species are to be selected. Rodents (including genetically modified rodents) or non-rodents may be required. For example, for general toxicity studies, rodents (rat or mice) may be selected. The choice may depend, e.g. on the preference for the species used in previous testing (comparability of the studies), species-specific properties (e.g. **10.1 c en 10.2 g** in one **10.1 c en 10.2 g** the toxicity testing in the same species). The species –sometimes multiple- is guideline driven for industrial chemicals and pharmaceuticals.
- 14) **Possibility of combining studies:** whether (parts of) studies can be combined, without compromising the scientific validity (e.g. combining in vivo genotoxicity testing with general toxicity testing).
- 15) **Necessity of 10.1 c en 10.2 g studies/groups:** The necessity of **10.1 c en 10.2 g** studies (e.g. **10.1 c en 10.2 g** studies), additional studies (e.g. **10.1 c en 10.2 g** studies) or additional groups (e.g. in case of **10.1 c en 10.2 g** studies using **10.1 c en 10.2 g** substances, **10.1 c en 10.2 g** control groups or in case of **10.1 c en 10.2 g** dose-effect relationships) is being established.

This project consists of four components as summarized below. A more detailed description is given in Appendices 1-4.

- Appendix 1: General Toxicology
- Appendix 2: Developmental and Reproductive Toxicology
- Appendix 3: ADME (Absorption Distribution Metabolism Excretion) and DMPK (Drug Metabolism Pharmacokinetics)
- Appendix 4: Ecotoxicology

Appendix 1 – General Toxicology: The study procedures are performed to determine toxicity of a test substance in a specific animal species, which provide part of a rational basis for toxicological risk assessment in man and animals. Results of studies are used to develop safety guidelines to reduce exposure risks for different populations. A wide spectrum of toxicology studies can be differentiated ranging from **10.1 c en 10.2 g** studies in e.g. rats, mice, rabbits, dogs, using various routes of administration (e.g. oral gavage, (intra)dermal, inhalation).

Appendix 2 - Developmental and Reproductive Toxicology (DART): The study procedures are performed to determine developmental and/or reproductive toxicity of a test substance in a specific animal species, which provide part of a rational basis for toxicological risk assessment in man. Results of DART studies are used to develop safety guidelines to reduce exposure risks for different populations, including pregnant women, infants and young children. Generally, DART studies can be divided into two types, which can sometimes be combined: 1) Developmental toxicity focuses on pre-natal development of the embryo or fetus. Toxicity may manifest as death of the embryo or fetus, abnormal development or birth defects or retardation of normal growth patterns and 2) Reproductive toxicity looks at all aspects of fertility. This includes the reproductive cycle, sexual behavior, gamete (sperm or egg) production and transport, fertility (including sperm quality and quantity), pregnancy outcomes, gestation, birth, lactation and maternal behavior. These studies also examine postnatal survival, growth and development of offspring. Some studies look at multiple generations to detect heritable effects.

Appendix 3 - ADME (Absorption Distribution Metabolism Excretion) and DMPK (Drug Metabolism Pharmacokinetics): ADME / DMPK studies are conducted to obtain adequate information on absorption, distribution, biotransformation (i.e. metabolism) and excretion of test substances, to relate concentration (or dose) and time course to the observed toxicity and to aid in understanding mechanism of toxicity. Kinetics may help to understand the toxicology studies by demonstrating that the test animals are systemically exposed to the test substance and by revealing which are the circulating entities (10.1 cen 10.2 g). Basic kinetic parameters determined in these studies will also provide information on the potential for accumulation of the test substance in tissues and/or organs and the potential of biotransformation following exposure to the test substance. Together with data from toxicity studies, these kinetic data provide a rational basis for risk assessment in man and animals. In addition, pharmacokinetic studies will provide data to evaluate the research program by supporting: candidate selection (whether or not a candidate should be developed); selection of formulations; treatment regimens, dose levels and/or routes of administration.

Appendix 4 - Ecotoxicology: The study procedures are performed to determine the toxicity of a test substance in a specific animal species (fish or frog), which provide part of a rational basis for environmental risk assessment. Ecotoxicology testing focusses on the three trophic levels in the food chain, being algae, daphnia and fish. Effects of test substances on either of these species will affect the environment. It is of high importance to know the toxicity of a test substance before and during production, transportation and use, to prevent, where possible, any unwanted effects on the environment.

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.

Laws, regulations and guidelines are the main driver of the steps/milestones in a study or package of studies. In general, the first step consists of a small study of short duration and a limited number of animals. This will provide essential information on doses for subsequent studies, potential adverse effects and/or intrinsic hazards with the test item. Based on the outcome, further studies of longer duration (e.g., 10.1 cen 10.2 g) are initiated. With each step, more test substance-related knowledge is obtained and applied (e.g. for dose level selection) in the next guideline driven study. For example, for pharmaceutical substances, following the selection of a clinical drug candidate, a number of preclinical Investigational New Drug (IND)-enabling studies are conducted.

Process and content of a study:

Each study is managed by a Study Director, an experienced and competent (according the Law on Animal Experimentation (WoD)) scientist responsible for the overall design and conduct of the study, who works closely together with the client, contributing scientists and (bio)technicians. In the case of in-vivo studies, the AWB and the Designated Veterinarian (further referred as 'Veterinarian') are consulted on questions regarding animal welfare and health. For the more complex studies (often pharma related) a 'pre-study briefing' is performed with the involved staff by the SD to ensure awareness/understanding of the study objectives and design by the animal staff. Specific attention will be paid to possible adverse effects of the substance, minimizing the severity, and being in-line with achieving study objectives.

In general, each in-vivo study is divided in different phases (details per type of study are included in the Appendices):

- An acclimation phase: animals will be habituated to their environment, which promotes both animal welfare and reproducible experimental results.
- A pretest phase: (most commonly included in non-rodent studies) administration of the substance and comparison of data with baseline details to refine the experimental set-up of the treatment phase.
- Treatment phase: substances and, if needed, **10.1 c en 10.2 g** control substances (or **10.1 c en 10.2 g**) are administered by scientifically relevant routes, followed by measurements, and/or collection of body fluids, excreta and/or organs/tissues for subsequent analysis.
- Recovery phase: to assess the reversibility of observed effects.

Further, for all phases, substances can be administered by varying routes, with frequency and duration varying from a single dose to repeated dosing for several weeks depending on study objectives. The most commonly used frequency is once daily, but it may range from once every selected period (e.g. once every two weeks) to multiple times per day. Duration of treatment ranges from one day up to 2 years. The route and frequency will be detailed in the study plan. Treatment in fasted or fed animals is possible depending on substance characteristics. During the pretest, treatment and/or recovery phase, besides the above mentioned administration of substances, sampling of fluids, surgical procedures such as the implantation of a catheter and measurements including ECG may be conducted. All treatment specifications and justifications will be documented in the study plan and will be subject to review of the Animal Welfare Body according Wod art 10.1.3.

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	General Toxicology
2	Developmental and Reproductive Toxicology
3	ADME (Absorption Distribution Metabolism Excretion) and DMPK (Drug Metabolism Pharmacokinetics)
4	Ecotoxicology
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

Aanpassingen voor wijziging 10.2 e. eng in rood

1. Aanvraagnummer: 10.2 e. eng
2. Titel van het project: In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods.
3. Titel van de NTS: Proefdieronderzoek ter bepaling van de veiligheid van (dier)geneesmiddelen, (agro)chemicaliën, biociden, medisch hulpmiddelen, en voedingsmiddelen, voor mens, dier en milieu.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer 10.2 e. eng
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: 10.1 c en 10.2 g
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.1 c en 10.2 g
 - e-mail adres contact persoon: 10.1 c en 10.2 g
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ┆ ontvangen door DEC: 11-7-2020
 - ┆ aanvraag compleet: 11-7-2020
 - ┆ in vergadering besproken: schriftelijk behandeld (e-maildiscussie)
 - ┆ anderszins behandeld:
 - ┆ termijnonderbreking(en) van / tot: van 27-8-2020 tot 4-9-2020
 - ┆ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ┆ aanpassing aanvraag: 4-9-2020
 - ┆ advies aan CCD: 14-8-2020
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

De aanvraag is afgestemd met de IvD.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
 - Datum: n.v.t.
 - Plaats: n.v.t.
 - Aantal aanwezige DEC-leden: n.v.t.
 - Aanwezige (namens) aanvrager: n.v.t.
 - Gestelde vraag / vragen: n.v.t.
 - Verstrek(e) antwoord(en): n.v.t.
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag n.v.t.

3 augustus 2017

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 4-9-2020 (vragen gestuurd, zie termijnonderbreking bij 6)
- Gestelde vraag/vragen: zie onder vraag 9
- Datum antwoord: 4-9-2020
- Verstrek(t)e antwoord(en): zie onder vraag 9
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

Onze vragen:

1. De DEC heeft vragen over de rechtvaardiging van de aantallen dieren en de onderbouwing van met name het aantal extra benodigde konijnen. Kunt u de aantallen extra dieren nader onderbouwen, bijvoorbeeld met schattingen van aantallen studies die ten grondslag liggen aan de gewijzigde aantallen?

De voorgestelde aanpassingen hangen nauw samen met een verhoogde vraag vanuit de (agro)chemische en farmaceutische industrie voor uitvoer van regelgedreven studies op basis van besluiten van de Europese Commissie voor chemische producten (ECHA) en instanties voor toelating van geneesmiddelen. Aanleiding voor deze verhoogde vraag kan mede gelegen zijn in het feit dat de ECHA meer dan 30% van de ingediende dossiers als incompleet heeft bestempeld (oktober, 2018) en zonder aanvullend onderzoek niet accepteert voor evaluatie en registratie (zie ook punt 4). Dit betreft met name de uitvoer van studies met ratten naar effecten op het nageslacht, studies met konijnen en ratten naar ontwikkelingsstoornissen en aangeboren afwijkingen, als ook studies naar effecten op het milieu met vissen en klauwkickers.

Inzake de verhoogde vraag naar het aantal konijnenstudies betreft dit voor het grootste deel (80-90%) de OECD 414 test. Per te onderzoeken stof bestaat de studie in de regel uit een Tolerability Study (met gemiddeld 6 konijnen), een Dose Range Finding Study (met gemiddeld 216 konijnen (=4 groepen x 6 drachtige konijnen + 24 nesten x foeten/nest)) en een Main Study (met gemiddeld 792 konijnen (=4 groepen x 22 drachtige konijnen + 88 nesten x 8 foeten/nest)). Per OECD 414 studiepakket betreft dit derhalve ca. 1000 konijnen. Met 12-15 studies per jaar betekent dit een aantal van 12000-15000 konijnen op jaarbasis.

2. Het konijn is een minder courant model in vaccinonderzoek, maar wordt voor sommige veterinaire vaccins gebruikt en voor de pyrogeniciteitstest. Voor deze laatste test bestaan alternatieven. Omdat de toename van aantallen konijnen zeer significant is, en u een relatie legt tussen konijnen en vaccinonderzoek, zou de DEC het gebruik van de extra konijnen graag verder toegelicht en onderbouwd willen zien.

In lijn met wat de DEC stelt, 'zijn er alternatieven voor pyrogeniciteitsstudies' en voeren wij dit type studies niet uit.

Wel voeren wij vaccin studies uit met konijnen, maar dit is percentueel gering in aantal (ca 10%) in vergelijking met het aantal OECD 414-studies als onder punt 1 en 4 van verdere onderbouwing voorzien.

3. Worden de extra dieren alleen gebruikt vanuit een wettelijke vereiste, of is er ook sprake van onderzoek dat niet wettelijk verplicht is?

Het antwoord hierop is, 'ja, alleen onderzoek in het kader van een wettelijke verplichting, aannemende dat hier ook de noodzakelijke validatiestudie (om aan te tonen dat met de testopzet het beoogde doel kan worden bereikt) mag worden

verstaan'. Dit heeft in de projectaanvraag betrekking op de OECD 241 studie (Appendix 4, Larval Amphibian Growth and Development Assay).

4. In de praktijk blijkt dat veel studies moeten worden uitgevoerd vanwege het feit dat registratiedossiers niet voldoen aan de wettelijke basisvereiste. Zie ook een recente publicatie, "*Checks on more than 3,800 REACH dossiers have found that 32% for substances at tonnage levels of 1,000tpa and above were found to be non-compliant*" (REACH registration project finds low compliance rates, 03 October 2018, Major German exercise finds one-third of dossiers lack data). Maakt dit onderzoek ook onderdeel uit van de gewijzigde vraag naar contractresearch bij uw organisatie? Indien dit het geval is, kunt u dit dan vermelden in uw aanvraag en in de NTS?

Wij hebben zeker de indruk dat dit een trigger vormt voor de verhoogde vraag naar 10.1 c en 10.2 g die wij ervaren (en in deze projectwijzigingsaanvraag hebben verdisconteerd). Onze analyse is dat met name het aantal studies met konijnen een grote(re) toename ondervindt omdat deze in eerste instantie vaak door de indieners zijn 'gewaived', met als argument dat er reeds een OECD 414 studie in de rat beschikbaar is. De registratie autoriteiten accepteren deze redenatie evenwel niet. Dank voor de suggestie om dit punt in de aanvraag en NTS op te nemen (is doorgevoerd).

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunning plichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunning plichtig is en of daar discussie over geweest is.
Indien niet vergunning plichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
Het project is vergunningplichtig. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning.
De aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
De DEC heeft voldoende expertise om hierover te adviseren. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.
Indien van toepassing, licht toe waarom.
Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag. Alle leden hebben onpartijdig en onafhankelijk deel kunnen nemen aan de advisering.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*). De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.

De aanvraag betreft richtlijn-gedreven onderzoek aan (dier)geneesmiddelen, (agro)chemicaliën, biociden, medische hulpmiddelen en voedingsingrediënten gericht op veiligheidsrisico's voor mens dier en milieu. Het onderzoek wordt uitgevoerd om te voldoen aan de registratie eisen van overheden en autoriteiten wereldwijd die zijn vastgelegd in wet en regelgeving. Verschillende aspecten van de schadelijke werking worden onderzocht in diverse dierproeven. Welke dierproeven daartoe nodig zijn en hoe zij moeten worden uitgevoerd wordt bepaald door de aard van de stof en is beschreven in internationale wet en regelgeving. Voor de overzichtelijkheid zijn de dierproeven in deze aanvraag gegroepeerd in vier appendices. De DEC **10.1 c en 10.2 g** is van mening dat deze terecht zijn ondergebracht in één project omdat zij voortvloeien uit wettelijke verplichtingen, en hetzelfde einddoel dienen. Verder ook omdat voor elke stof geldt dat resultaten van studies uit verschillende appendices nodig kunnen zijn voor de beoordeling van de veiligheid van stoffen/producten voor mens, dier en milieu en opgenomen worden in een registratiedossier van de betreffende stof/product en in die zin dan in samenhang worden uitgevoerd.

De aanvraag betreft een parapluaanvraag van een **10.1 c en 10.2 g**. Dit betekent dat de DEC niet op stof/product-niveau kan toetsen, aangezien stof/product-informatie op voorhand niet beschikbaar is. Niettemin is de aanvraag toetsbaar, op basis van de samenhang van de diverse studies en het feit dat de studies richtlijn gedreven zijn.

Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.

Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet). Voor zover bij de DEC bekend is er geen tegenstrijdige wetgeving. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

2. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De project aanvraag geeft helder aan dat het aanvraag betreft voor "wettelijk vereist onderzoek" en daarnaast voor "onderzoek ter bescherming van het milieu ter bescherming van de gezondheid van mens of dier". In het projectvoorstel is helder beschreven welke typen dierproeven met welke doelen worden aangevraagd. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

Belangen en waarden

3. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel is het verzamelen van gegevens over de schadelijke werking van stoffen/producten. Verschillende aspecten van die schadelijke werking worden onderzocht in verschillende (typen) dierproeven die zijn beschreven in 4 appendices. Voor elke stof of product wordt vastgesteld welke gegevens exact nodig zijn (en dus welke dierproeven moeten worden uitgevoerd). Welke dat zijn, wordt bepaald door overheden en is vastgelegd in wettelijke kaders. Deze gegevens zijn nodig voor de (registratie) dossiers en zijn cruciaal voor de

inschatting van de risico's voor mens, dier en milieu (uiteindelijk doel). De wettelijke kaders in diverse landen geven aan welke aspecten beoordeeld moeten worden om de veiligheid van stoffen en producten vast te kunnen stellen. De relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel voor alle dierstudies in dit project beschreven is dus vastgelegd in wet- en regelgeving. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

4. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

Belanghebbenden	Morele waarden
Maatschappij	Nieuwe stoffen en producten die op de markt komen moeten veilig zijn voor mens, dier en milieu. Nieuwe stoffen en producten zijn van belang voor bijvoorbeeld de gezondheid en/of voeding van mens en dier. Hierdoor kan de kwaliteit van leven verbeterd worden.
Proefdieren	Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.
Overheden	Verantwoordelijk voor de veiligheid van burgers Eist resultaten van dierproeven voor risico inschatting.
Industrie	Commerciële belangen. Belang om veilige producten op de markt te brengen.
Vergunninghouder (onderzoekers)	Commerciële belangen. Belang om kwalitatief goede dierproeven uit te voeren (borging onderzoekskwaliteit) in relatie tot dierenwelzijn.

Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.

5. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.

De DEC gaat ervan uit dat de vergunninghouder voldoet aan alle voor de uitvoering van dit project relevante wettelijke milieu eisen. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

Proefopzet en haalbaarheid

6. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

De studies worden uitgevoerd volgens internationaal voorgeschreven test richtlijnen. De aanvrager heeft langdurende ervaring met richtlijn gedreven onderzoek. De DEC is ervan overtuigd dat voldoende ervaring en deskundigheid in het bedrijf aanwezig is om dit onderzoek uit te voeren. Ook is de DEC overtuigd van voldoende kennis en deskundigheid om 3V-beginselen te waarborgen mede gezien de vermelde activiteiten van de vergunninghouder in het 3V-centrum en het Europese Lab Animal Science netwerk. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

7. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).*

- Bij elk verzoek vanuit de industrie voor een dierproef wordt eerst specifieke informatie verzameld over de betreffende stof of product aan de hand van de 15 punten vragen lijst (zie project aanvraag paragraaf 3.4.2). Op grond van de verkregen informatie wordt vastgesteld of aanvraag richtlijn gedreven onderzoek betreft en welke dierproeven (beschreven in 1 of meer appendices) hiervoor noodzakelijk zijn. De DEC is ervan overtuigd, dat deze strategie en de afstemming van het studieplan met de IvD goede waarborgen geeft voor een optimale uitvoering van dierproeven voor het verkrijgen van de gegevens die door de registratieautoriteiten worden gevraagd en waarbij 3V aspecten optimaal worden geborgd (zie ook de beantwoording van vraag 3 in de bijlage).
- De uitkomstparameters van de dierproeven zijn helder en logisch beschreven in (inter)nationale uitvoeringsrichtlijnen en worden door de autoriteiten benoemd.
- Omdat richtlijngedreven dierproeven (in het algemeen) robuust zijn en de betrokken medewerkers deskundig en de infrastructuur adequaat, beoordeelt de DEC de uitvoerbaarheid van het project als zeer goed.

Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.

Welzijn dieren

8. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn), zie E1.
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2): Bij sommige dieren kan na een wachtperiode sprake zijn van hergebruik, mits het ongerief beperkt is gebleven tot maximaal matig.
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.

9. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De dieren worden gehuisvest conform bijlage III van Richtlijn 2010/63/EU. In specifieke gevallen kan hiervan worden afgeweken om wetenschappelijke en/of dierenwelzijnsredenen. Deze worden in de aanvraag goed onderbouwd (tijdelijk

verblijf in metabolisme kooien, of individuele huisvesting om vechtgedrag te voorkomen, of om beschadiging van instrumentatie of beïnvloeding van dermale blootstelling te voorkomen. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

10. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

Het ongerief is door de onderzoekers per appendix ingeschat, op basis waarvan een algemene inschatting voor de gehele project aanvraag is maakt. Het ongerief dat veroorzaakt wordt door de uitvoering van de dierproeven (procedures) is goed te voorspellen en zal zelden de classificatie matig overschrijden. Ongerief veroorzaakt door toxiciteit van de stof is niet altijd goed te voorspellen. De DEC is van oordeel dat de procedures zo worden ingericht en humane eindpunten zodanig worden toegepast dat ernstig ongerief door de stof/product tot een minimum wordt beperkt. De DEC is van oordeel dat het ongerief realistisch is ingeschat op basis van ervaring en historische data. De DEC kan zich vinden in de weergegeven cumulatieve inschattingen van ongerief zoals weergegeven in de NTS en appendices van de project aanvraag. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

11. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De integriteit van de dieren kan fysiek worden aangetast, door bijvoorbeeld toedieningswijze van een stof, door onthouding van voedsel of door een operatieve ingreep. Maar ook kan de gedragsmatige integriteit worden aangetast bijvoorbeeld door beperking van natuurlijk gedrag, of bewegingsvrijheid of individuele huisvesting. Daarnaast kunnen stoffen/producten of procedures stress en pijn veroorzaken. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

12. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC beoordeelt de criteria zoals gegeven voor humane eindpunten in de project aanvraag en appendices als adequaat, aangezien de dieren die pijn, stress of ongemak van 'niet tijdelijke aard' vertonen met kans op verergering, zullen worden geëuthanaseerd om langer of erger lijden te voorkomen. Hierin wordt gehandeld conform de Europese richtlijn als omschreven in het OECD Guidance document on humane end points (ENV/JM/MOMO/2000/7). *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

3V's

13. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

In deze projectaanvraag wordt wettelijk vereist proefdieronderzoek beschreven, waarvoor (inter)nationale regelgevende instanties bepalen welke dierstudies benodigd zijn of waar alternatieven mogelijk zijn. Op basis van vraag 10 in paragraaf 3.4.2 van de project aanvraag, wordt door de studieleider onderzocht of er alternatieven beschikbaar zijn die worden geaccepteerd door de betreffende autoriteit(en). De resultaten hiervan worden vastgelegd. De DEC heeft voor de wijziging een vraag gesteld (vraag 2) over alternatieven voor de pyrogeniciteitstest. Echter, uit het antwoord blijkt dat de aanvrager deze test niet uitvoert.

14. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Het 'minimale' aantal dieren dat in de studies gebruikt moet worden, is voorgeschreven in de test richtlijnen. In deze projectaanvraag wordt dit minimale aantal geïnterpreteerd als maximale aantal mits er wetenschappelijke redenen zijn om daarvan af te wijken. Afwijkingen (meer of minder) worden mede bepaald door de informatie uit eerder onderzoek en beschikbare informatie over de betreffende stof of product. Deze gegevens worden door de studie leider verzameld (zie bovenstaande vraag 8) en verwerkt in een studieplan. Het studieplan wordt zo opgesteld dat betrouwbare informatie wordt verkregen met minimale aantallen dieren. De DEC is van mening dat de benodigde aantallen proefdieren per studie goed worden onderbouwd in de appendices. Echter de totale aantallen dieren die in het kader van dit project worden aangevraagd worden voornamelijk bepaald door schattingen van de aantallen studies die in de komende 5 jaar worden verwacht. De aanvragers baseren deze verwachting vooral op navolgbare argumenten zoals historische data en marktontwikkelingen.

De wijziging betreft o.a. het aanpassen van de aantallen dieren per diersoort. Het aantal gaat van 265.850 naar 388.150 dieren, een stijging van 122.300 dieren. In de begeleidende brief geeft de aanvrager aan dat de reden hiervan is dat de vraag naar bepaalde studies met bepaalde dieren is toegenomen door onvoorziene omstandigheden.

10.1 c en 10.2 g DEC heeft een vraag gesteld over de onderbouwing van de extra aantallen, met name van de konijnen (vraag 1). Het antwoord daarop was grondig en verhelderend.

15. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De mogelijkheden voor verfijning zijn beperkt vanwege voorgeschreven uitvoeringsrichtlijnen. Daar waar verfijning mogelijk is zonder de waarde van de bevindingen voor de betreffende autoriteiten aan te tasten zal hierop worden gestuurd tijdens het opstellen van het studieplan.

De DEC is van mening dat de studies zoals opgenomen binnen de projectaanvraag voldoen aan de vereisten voor verfijning van dierproeven, onder andere door de toepassing van de criteria voor humane eindpunten, de training van biotechnici en de frequentie van monitoring. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

16. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

Binnen de diverse wettelijke kaders zijn wetsartikelen opgesteld om het dupliceren van onderzoek te voorkomen, zoals bijvoorbeeld voor industriële chemicaliën (artikel 25 van Verordening 1907/2006), biociden (artikel 62 van Verordening 528/2012) en gewasbeschermingsmiddelen (artikel 8, 33, 61 en 62 van Verordening 1107/2009). Daarnaast zullen voor nieuwe stoffen of producten (bijvoorbeeld geneesmiddelen) geen gelijke studies beschikbaar kunnen zijn. Voorafgaande aan de ontwikkeling van een studieplan zal de studie leider zich hiervan vergewissen (zie punt 9 genoemd onder paragraaf 3.4.2. van de projectaanvraag). De DEC is van mening dat studie leiders hiertoe zijn gekwalificeerd. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

17. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het geslacht van de dieren wordt over het algemeen voorgeschreven in de test richtlijnen. Sommige richtlijnen schrijven gebruik van beide geslachten voor, andere richtlijnen laten de geslachtskeuze open, soms zijn er wetenschappelijke redenen voor gebruik van mannelijke of slechts vrouwelijke dieren. Soms kan de keuze voor één geslacht worden gebaseerd op resultaten van eerder onderzoek (uit een of meerdere studies uit een van de appendices of reeds beschikbare gegevens). De informatie verzameld in de vragenlijst uit de project aanvraag zal mede bepalen of het onderzoek met beide geslachten of met het meest gevoelige geslacht voor de betreffende stof of eindpunt wordt uitgevoerd. De DEC is van mening dat dit afdoende is beschreven in de project aanvraag en appendices. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

18. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeldt staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

In verreweg de meeste studies worden de dieren in het kader van de proef gedood voor de bepaling van uitkomstparameters in bloed, organen en weefsels (bijvoorbeeld teststof concentraties, (histo)pathologie of biomarkers). De DEC is van oordeel dat dit voldoende wordt onderbouwd in de appendices. De dieren worden gedood conform de methoden vermeld in bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

19. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Wanneer honden, katten of varkens niet worden gedood in het kader van de studie, zoals hierboven beschreven, kan hergebruik of herplaatsing worden overwogen. Bij pharmaco/toxicokinetisch onderzoek (beschreven in appendix 3) kunnen dieren na een wachtperiode worden hergebruikt indien het voorafgaande ongerief beperkt is gebleven tot maximaal matig. Bij een zeer gering percentage dieren (bijvoorbeeld katten) kan adoptie tot de mogelijkheden behoren. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

NTS

20. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

De DEC is van mening dat de NTS een goede weergave is van de projectaanvraag. De NTS is met de wijzigingsaanvraag conform aangepast.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

3 augustus 2017

De centrale morele vraag is of de nadelige gevolgen voor de meer dan 260.000 dieren uit de projectaanvraag met ongerief scores van mild tot ernstig opweegt tegen de informatie die wordt verkregen uit de dierstudies die nodig zijn om een veiligheidsbeoordeling voor mens, dier en/of milieu uit te voeren voor stoffen en producten die op de markt worden gebracht. Met de wijziging moet deze vraag gesteld worden voor 388.150 dieren.

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

Voor de samenleving is het van groot belang dat de stoffen en producten die op de markt komen veilig zijn voor mens, dier en milieu. Veiligheidseisen gelden niet alleen voor de toepassing van de stof of product, maar ook voor productie, vervoer en opslag. Veiligheidseisen zijn vastgelegd in (inter)nationale wet- en regelgeving en voor dat doel wordt er door autoriteiten onder meer om gegevens gevraagd die alleen uit proefdieronderzoek kunnen worden verkregen. Voor overheden is het van groot belang om de juiste informatie te verkrijgen op basis waarvan veiligheidsrisico's kunnen worden ingeschat.

Hier tegenover staat dat het doen van dierproeven maatschappelijk als problematisch wordt beschouwd en de voorkeur gegeven zou worden aan niet-dierproef afhankelijke technieken. Voor de in deze aanvraag beschreven dierproeven zijn nog geen - door alle autoriteiten (wereldwijd) geaccepteerde - alternatieven beschikbaar.

Voor de proefdieren worden geen belangen gediend maar wel geschaad (ongerief, aantasting welzijn en integriteit).

De industrie die de stoffen/producten op de markt brengt heeft een commercieel belang, maar heeft evenzeer belangen met betrekking tot de veiligheid van die stoffen/producten. Gezien de tijd en kosten die gepaard gaan met de uitvoering van dierproeven zal de industrie deze studies zoveel mogelijk willen beperken het geen het risico op niet-noodzakelijke dierproeven verder minimaliseert.

Voor de vergunninghouder is er financieel belang, immers een [REDACTED] die zich richt op wettelijk verplicht onderzoek dankt hieraan haar bestaansrecht. Echter, de vergunninghouder is ook betrokken bij de ontwikkeling en uitvoering van diverse *in vitro* of *in silico* alternatieven voor dierproeven en zal daar waar beschikbaar en mogelijk deze alternatieven ook aanbieden of resultaten hieruit aanwenden voor verfijning van richtlijn gedreven studies. Tevens is er een belang voor de vergunninghouder om kwalitatief goede dierproeven uit te voeren in relatie tot dierenwelzijn en maatschappelijk draagvlak. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Overheden stellen methodieken voor veiligheidsbeoordeling vast en verplichten

producenten hiervoor relevante gegevens aan te leveren. Die gegevens komen uit allerlei domeinen inclusief fysisch-chemische eigenschappen, milieu/residu veldstudies, informatica, en biologie. Van dat laatste betreft een klein deel, onderzoek aan levende dieren die onder de Wod vallen. Deze proefdierstudies worden volgens internationale test richtlijnen uitgevoerd, welke door overheden zijn voorgeschreven. De resultaten van de proefdier studies zijn voorspellend voor de mogelijke schadelijke werking van de stof/product voor mens, dier en milieu.

Het project is in de ogen van de DEC dan ook van groot maatschappelijk belang. De vergunninghouder is gespecialiseerd in het uitvoeren van richtlijngedreven onderzoek voor derden en is in staat om kwalitatief goede dierproeven uit te voeren met aandacht voor dierwelzijn. Het grote aantal dieren wordt behalve door de aard van de dierproeven vooral bepaald door de verwachte werkportefeuille. Welke dierproeven moeten worden uitgevoerd alsook op welke wijze waarop dit dient te gebeuren wordt in belangrijke mate door overheden bepaald. Meewegende dat het onderzoek door overheden wordt voorgeschreven, de aanvrager optimaal invulling geeft aan 3 V's, beschikt over voldoende gekwalificeerd personeel en adequate infrastructuur, een uitstekende record heeft met de uitvoering van dergelijk onderzoek en de haalbaarheid als zeer hoog wordt ingeschat is de DEC van mening dat het beschreven ongerief van de dieren opweegt tegen het belang van het in dit project beschreven dierproeven.

Op basis van bovenstaand kan de DEC **10.1 c en 10.2 g** concluderen dat het gebruik van de dieren binnen dit project gerechtvaardigd is.

Hoewel er onzekerheid is over de precieze oorzaak van de toegenomen vraag naar de betreffende studies, is deze toename blijkbaar een feit. **10.1 c en 10.2 g** DEC heeft gezien de aanzienlijke toename opnieuw een afweging gemaakt en concludeert dat ook met het toegenomen aantal dieren, hoewel dit aanzienlijk is, het belang van het doen van de dierproeven gerechtvaardigd is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten: nadere onderbouwing van de herkomst en gebruik van katten die niet voor onderzoek zijn gefokt. De argumentatie zoals eerder gedeeld met de CCD de visie hierop weergegeven in brief d.d. 25 april 2016 van de CCD aan de VGH geeft afdoende informatie voor de DEC om op voorhand een positief advies te kunnen geven.

Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen: ,
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren: ,
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag: ,

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn

3 augustus 2017

op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is unaniem tot stand gekomen. 1 DEC lid was niet aanwezig tijdens de vergadering op 31 juli 2017, maar heeft schriftelijk aangegeven positief te adviseren over deze project aanvraag. Ook het advies over de wijziging is unaniem tot stand gekomen, nu in 10.1 c en 10.2 g DEC.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd bij wettelijk vereist onderzoek zoals beschreven in deze aanvraag:

Voor sommige proefdierstudies zijn *in vitro* alternatieven beschikbaar. Echter, deze worden nog niet door alle autoriteiten (wereldwijd) geaccepteerd. Daar waar autoriteiten deze alternatieven niet accepteren zullen nog steeds dierproeven vereist zijn voor de registratie of toelating van stoffen/producten.

Wereldwijd worden steeds nieuwe stoffen op de markt gebracht waaraan de samenleving hoge eisen worden gesteld met betrekking tot de veiligheid daarvan. De DEC 10.1 c en 10.2 g kan niet waarderen wat het belang is van elk van deze nieuwe stoffen/producten aangezien de diversiteit in stoffen/producten en gebruikers (maatschappij, dieren, patiënten, beroepsmatig, etc.) groot is en omdat informatie over specifieke stoffen en producten in een 10.1 c en 10.2 g niet bekend zijn. Wel erkent de DEC op voorhand het grote belang van veiligheidseisen van alle in de productaanvraag genoemde categorieën van stoffen en producten. *Niet gewijzigd ten opzichte van oorspronkelijk advies.*

Bijlage: vragen van 10.1 c en 10.2 g aan VGH

Vragen gesteld in zwart op 16 juni 2017
Antwoorden in blauw door VGH op 21 juli 2017

Projectvergunningaanvraag

1. Paragraaf 3.4 General strategy: In de eerste alinea wordt aangegeven dat de vijftien items zoals aangegeven in 3.4.2 vooraf moeten worden beoordeeld om de wettelijke noodzakelijkheid van de studie te beoordelen. In de tweede alinea wordt aangegeven dat alle informatie over de teststof karakteristieken en beschikbare achtergrond worden meegenomen om tot een ontwerp van een studie plan te komen. De DEC ziet graag uitleg wat er met “all known test substance characteristics” en “available background information ” wordt bedoeld, en hoe dit in relatie staat tot the 15 items van paragraaf 3.4.2?

De tekst in de aanvraag is hier als volgt op aangescherpt: “*All known test substance characteristics (shared by the sponsor) and available background information (from sponsor and public available literature) will be taken into account in the design of the study.*”. Deze informatie verkregen worden op verschillende manieren, onder meer in de eerste fase waarin de 15-items checklist wordt gebruikt in het contact met de klant. Zie verder ook punt 3.

2. Paragraaf 3.4 Research strategy: Er wordt melding gemaakt van “studies in farm animals”. Echter, de DEC is van mening dat er bij 10.1 c en 10.2 g geen studies met landbouwhuisdieren uitgevoerd, en deze zijn ook niet opgenomen in de lijst met proefdieren in deze paragraaf. De DEC vraagt u hierover een toelichting te geven.

Dit is een terechte constatering, de verwijzing naar landbouwhuisdieren is verwijderd uit de aanvraag.

3. Paragraaf 3.4.2: Hoe gaat de ‘15 points questionnaire’ gebruikt worden en hoe wordt dat geborgd? Hoe worden vooral de 3V aspecten optimaal betrokken in het studieplan en wie ziet daarop toe? De DEC vraagt op dit punt een overtuigende beschrijving van technisch uitvoerbare stappen. Deze vraag wordt onvoldoende beantwoord in de huidige aanvraag. Er wordt het volgende aangegeven in section 3.4.2: prior to the start of the in vivo study the following 15 items will be evaluated:” Het is onduidelijk bij wie deze verantwoordelijkheid ligt, wie toeziet op juistheid en volledigheid van de verstrekte informatie en op welke wijze dit deze informatie wordt meegenomen bij het opzetten van het studie plan. Kan de VGH hier iets over aangegeven? Bij onvoldoende duidelijkheid zal de DEC dit in haar advies naar voren laten komen.

Op hoofdlijn ziet dit proces, dat zo veel mogelijke op digitale wijze wordt vormgegeven, er als volgt uit: Customer <-1-> Business Developer/Customer Service 10.1 c en 10.2 g <-2-> Department Head/Section Head <-3-> Study Director <-4-> IvD.

De Vergunninghouder faciliteert het geschetste proces. Reeds in contactmoment <-1-> wordt informatie voor de 15-item checklist verzameld. In ‘schakel’ <-2-> wordt indien nodig geacht, aanvullend contact met de Customer gezocht over de beoogde studie en het kader van de Projectvergunningaanvraag. Op basis van beschikbaarheid en expertise wordt de Study Director <-3-> voor uitvoer van het project aangezocht. Verantwoordelijkheid ligt bij de Study Director (‘single point of control’) om zich vooraf te vergewissen dat er voldoende grond bestaat (evaluatie 15-item checklist; mogelijk andere informatie) om tot een proefdierstudie over te gaan. Het door de SD opgestelde studieplan en aangeleverde achtergrondinformatie zal vervolgens door de IvD (<-4->) worden getoetst of dit binnen de kaders van de door de CCD goedgekeurde projectvergunningaanvraag (PVA) past.

4. Paragraaf 3.4.2: Kan de VGH aangegeven wat de samenhang is tussen de appendices? Duidelijk is dat de vier Appendices verschillende typen dierproeven beschrijven, waarvan de resultaten terecht kunnen komen in het veiligheidsdossier van de stof (gemeenschappelijk einddoel). Echter, binnen het veiligheidsdossier zullen de studies ook een samenhang hebben. Sommige studies zullen “tick-box” studies zijn, studies die altijd nodig zijn, andere studies volgen weer uit eerder onderzoek (higher-tier studies). De VGH wordt gevraagd om de onderlinge samenhang en/of afhankelijkheid te beschrijven. Het klopt dat de 4 Appendices verschillende type dierproeven beschrijven. Deze indeling is gemaakt

analoog aan een relatief gangbare indeling in type toxicologisch onderzoek en aan de afdelingen welke binnen ■ ook volgens deze systematiek zijn ingericht. De samenhang is dat elke Appendix onderzoek naar de veiligheid van een product beschrijft echter elk op een speciaal aspect daarvan. Vaak wordt het totale registratie dossier van een product samengesteld met studies uit de verschillende Appendici. Bijvoorbeeld de uitvoer van een farmacokinetiek studie in ratten (Appendix 3) gevolgd door een 'herhaald doseer-studie' in dezelfde diersoort (Appendix 1). Waarna, afhankelijk van de uitkomst, een reproductie toxicologische studie in ratten (Appendix 2) en een ecotoxicologische studie (Appendix 4) kunnen volgen.

5. Paragraaf 3.4.3. Er wordt het volgende aangegeven: "For most studies a pre-study briefing is performed". Kan de VGH nader specificeren wat er met "most studies" wordt bedoeld, b.v. geldt dit specifiek voor een bepaald type studies?

Onze excuses voor de onduidelijkheid. De tekst is aangepast naar: "for the more complex studies (often pharma related), a pre-study briefing is performed". Voor de kleinere/meer standaard type studies, wordt in ieder geval het (draft)protocol tijdig gedeeld met betrokkenen om kennis te laten nemen van relevante studie-informatie.

6. Verwijzend naar Wob art 10.1.3. lezen wij de tekst zo dat de IvD toetst of het studieplan past binnen de vergunning. Graag vernemen wij of dit in overeenstemming is met uw bedoeling.

Aannemend dat er een typo staat bij 'Wob' en dat dit 'Wod' moet zijn, kunnen wij bevestigen dat de IvD elk studieplan toetst of dit past in de vergunning. Zie ook de beantwoording van bovenstaande punt 3.

Appendix 1

7. Hoofdstuk A/B, table 1/2: er wordt geen expliciete vermelding gemaakt van de test richtlijnen, zoals dat in de andere appendices wel is gedaan. Kan de VGH aangeven welke test richtlijnen in deze appendix zijn meegenomen?

Gezien het grote aantal testrichtlijnen dat van toepassing is op studies met proefdieren in de 'General Toxicology', is gekozen om deze –met het gevaar niet compleet te zijn- om op dit gebied de hoofdkaders aan te geven (o.a. ICH, OECD; zie ook Project Proposal pagina 2). Daar waar de scope van het proefdieronderzoek een kleiner/meer specifiek kader kent (Developmental and Reproductive Toxicology, ADME en Ecotoxicology) zijn de testrichtlijnen nader gespecificeerd.

8. We begrijpen dat in tabel I met 'primary outcomeparameters' wordt bedoeld: 'purpose of the study' Is dat een correcte aanname?

Dit is inderdaad een correcte aanname. Voor de duidelijkheid is dit in de tabel aangepast.

9. De DEC vraagt zich af of dierproeven ten behoeve van de uitvoering van wettelijk vereiste in vitro/ex vivo studies (b.v. verkrijging cytosol of S9 fractie tbv in vitro endocrine disruptor studies en in vitro genotoxiciteitsstudies of isolatie van cellen voor in vitro interspecies metabolisme studies) aan appendix 1 toegevoegd moeten worden.

Dank voor deze constatering. Inderdaad is voor wettelijk vereiste *in vitro/ex-vivo* studies biologisch materiaal nodig, te verkrijgen uit dierproeven. Dit is toegevoegd aan de tabel.

Appendix 2:

10. Page 9 F Accomodation and care: In Appendix 1 en 3 staat dat de konijnen apart worden gehuisvest en dat dit afwijkt van de Directive 2010/63/EU. In Appendix 2 staat hier dat er geen afwijkingen van de Directive zijn, terwijl er verderop in het document (onder I) staat dat de konijnen alleen worden gehuisvest. We vragen de VGH hierop een toelichting te geven en waar nodig de teksten in de verschillende Appendici op dit punt gelijktrekken en aangeven in Appendix 2 onder punt F dat konijnen alleen worden gehuisvest.

Dit is correct opgemerkt door de Commissie en in alle Appendici gelijk getrokken door te benoemen dat de konijnen, en in bepaalde gevallen ook andere dieren, solitair gehuisvest zijn.

Appendix 3:

11. **De verwijzing naar SOPS maakt de 'policy for reuse' niet inzichtelijk.**
In de Appendix is toegevoegd: "In these SOP's, e.g. minimal wash-out period, maximal times for re-use, maximal overall number of blood samples has been described in close collaboration with the veterinarian and the AWB."
12. **Hergebruik van Honden en minivarkens na als ernstig-geclassificeerde procedures staat op gespannen voet met wetgeving en vraagt om zorgvuldige onderbouwing.**
De Commissie heeft gelijk dat hergebruik na als ernstig geclassificeerd gebruik zorgvuldig moet worden onderbouwd (Appendix 3, pagina's 4 en 6: Animals that had severe discomfort in retrospect will not be re-used).
Mogelijk verwarrende tekst over hergebruik van dieren na ernstig ongerief (onder C. Re-use, Yes Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.) is verwijderd.
13. **Hoofdstuk A, regel 9: Kan de VGH aangeven of dit enkel risk assessments voor de mens betreft of mogelijk ook voor mens en dier (b.v. in geval van veterinaire pharma)?**
Inderdaad, er vinden ook risk assessments plaats voor dieren. Dit is toegevoegd in regel 9 en 17.
14. **Hoofdstuk K: kan de VGH uitleggen wat in tabel 2, 2de kolom met % non-recovery <5% voor D(PK) studies voor bedoeld wordt?**
Hiermee wordt bedoeld het percentage dieren waarbij, tegen verwachting, geen herstel meer mogelijk is.
Notitie d.d 2-8-2017: De DEC heeft nog nadere correspondentie gevoerd met de VGH over dit punt. Non-recovery is een term die verschillend uitgelegd kan worden in de toxicologie en in het de dierproef registratie. In de toxicologie betreft het herstel van toxische effecten na de laatste dosering van de teststof. Echter, in de dierproefregistratie (op basis de richtlijn en uitvoeringsbesluit) is het een classificatie voor ongerief. De dierproef wordt uitgevoerd onder anesthesie en aansluitend gevolgd door euthanasie; het dier komt niet meer bij en zal dus geen ongerief als gevolg van deze dierproef ervaren. De VGH is gevraagd nog te kijken naar de tekst in appendix 3 hierover en waar nodig aan te passen.

Appendix 4:

NTS:

15. **Titel: De DEC signaleert dat er een verschil bestaat tussen de titels van de PVA en de NTS. Wettelijke vereiste studies lijkt wat strikter dan "in vivo studies to enable and support regulatory testing programs. Ook het milieu ontbreekt in de NTS titel.**
Om dit beter op elkaar te laten aansluiten is de titel als volgt aangepast: "Proefdieronderzoek ter bepaling van de veiligheid van (dier)geneesmiddelen, (agro)chemicaliën, biociden, medische hulpmiddelen, en voedingsingrediënten, voor mens, dier en milieu."
16. **Projectbeschrijving: De rol van ECHA wordt onjuist weergegeven. ECHA geeft geen goedkeuring voor industriële chemicaliën. Voor Agro chemicaliën is ECHA niet de competente autoriteit (EU Commissie).**
Dit is als volgt aangepast: Fabrikanten die de onder punt 1.1 genoemde producten op de markt willen brengen of houden, hebben hiervoor goedkeuring nodig van nationale en/of internationale overheidsinstanties-zoals de EMA (European Medicines Agency) en FDA (Food and Drug Administration; USA) voor geneesmiddelen en de Europese Commissie voor chemische producten
17. **Door dieraantallen per jaar te vermelden legt de aanvrager zichzelf onnodig jaarquota op (paragraaf 3.3)**
Dit is inderdaad niet nodig. Tabel aangepast naar een totaal over een 5-jaars periode.

18. De Negatieve gevolgen (paragraaf 3.4) omvatten eveneens operaties, houderij, bemonstering, voedselbeperking ed.
De volgende zin is toegevoegd: Daarnaast kunnen negatieve gevolgen worden ondervonden door de (tijdelijke) beperking van voedselinname, een noodzakelijke operatieve ingreep en (tijdelijke) wijze van huisvesting.
19. Punt 3.5: Kan de VGH aangeven hoe tot de inschatting van ongerief in percentages is gekomen? In de NTS is opgenomen: $\approx 55\%$ mild, $\approx 45\%$ matig en $\approx 5\%$ ernstig. Echter, appendix 1 zegt: 40-45% mild; 50-55% moderate; $<5\%$ severe, appendix 2 zegt: 40-45% mild; 50-55% moderate; $<5\%$ severe. Appendix 3 zegt: 40-50% mild; 40-50% moderate; $<1\%$ severe en appendix 4 zegt: 40-65% mild, 35-50% moderate, $<10\%$ severe. Op basis van 5% ernstig zoals opgegeven in de NTS, en de aantallen proefdieren, kan een aantal van > 13000 dieren met ernstig ongerief worden berekend. Is dat correct en kan iets gedaan worden om dit aantal te verlagen?
Hierbij is op basis van ervaringsfeiten over de afgelopen jaren een zo goed mogelijke schatting gemaakt, met inachtneming van de type onderzoeken als weergegeven in de verschillende Appendices. Zo kan bijvoorbeeld voor Appendix 4 gekeken worden naar de geschatte (5-jaars) aantallen van klauwpad (2750) en vis (22000). Bij een 'severe-percentage' van 10% levert dat een aantal op van 2475. Aangegeven is echter $<10\%$, dus ook 8% kan een reële schatting zijn. Dit levert dan 1980 gevallen op in de 'severe-categorie'. Over alle appendices heen brengt dit een getal wat 14530 (ofwel 2906 per jaar) indien de bovenkant van de severe-range wordt aangehouden. Naar verwachting ligt dit in de praktijk lager, waarbij onze schatting rond de 10000, ofwel 2000 per jaar, ligt. Binnen de wettelijke en 'animal welfare kaders' zal steeds maximaal worden ingezet en gehandeld om dit aantal zo laag mogelijk te laten zijn.
20. Punt 3.6: er wordt melding gemaakt van adoptie. In de PVA of appendices wordt hier geen melding van gemaakt. Kan de VGH aangeven of adoptie inderdaad binnen de PVA wordt meegenomen?
Er is de afgelopen jaren eenmalig sprake geweest van adoptie. Dit staat nu misschien te expliciet (groot) geformuleerd in de NTS en is aangepast.
21. Paragraaf 4.1: Is het nodig om in de NTS te verwijzen naar FELASA, 3V centrum, etc. Mogelijk kan wat minder tekst opgenomen worden en waarin helder wordt gemaakt dat voor de studies die binnen de PVA vallen er geen geschikte alternatieven zijn die door de autoriteiten goedgekeurd zijn. Waar toegestaan (in specifieke wettelijke kaders) zullen alternatieven worden toegepast.
Ja, wij achten de verwijzing(en) een relevant gegeven. Het geeft o.i. de uitvoer van het onderzoek (voor leken en niet-leken) een kader, dat door het bedrijf belangrijk en hoog wordt geacht.
Wellicht verder goed te noemen, dat er voor sommige aspecten van de studies wel alternatieven bestaan maar deze (nog) niet door autoriteiten zijn geaccepteerd.
22. Paragraaf 4.2 en 4.3: er wordt hier veel tekst gebruikt. Mogelijk is dit te ingewikkeld voor een NTS. Verwijzing naar SOPs heeft geen zeggingskracht aangezien ze niet openbaar zijn. Verwijzing naar guidance documenten lijkt te uitgebreid voor een NTS. Graag simpeler en beknopter formuleren.
Bij lezing door meerdere personen, wordt het grootste gedeelte van de huidige teksten toepasselijk/adequaat geacht. Zie de NTS voor enkele wijzigingen.
23. Door met name veel (overbodige of onjuist geplaatste) komma's niet altijd gemakkelijk te lezen met name in 3.1.
Leesbaarheid is op enkele punten (komma's) aangepast.

Naast bovenstaande opmerkingen/vragen is door de DEC leden nog een aantal andere opmerkingen/tekst suggesties gegeven. Beantwoording van deze vragen/opmerkingen is niet noodzakelijk voor de ethische toetsing door de DEC, echter, we willen deze vragen/opmerkingen wel delen met de VGH.

Projectvergunning aanvraag

1. Pagina 4: Choice of species: suggestie om deze alinea te deleten. De choice of species staat al beschreven in het opsomlijstje op dezelfde pagina. Het is ook niet waar dat de rodent altijd als voorkeursdier staat, zeker niet voor farmaceutische stoffen. Het zinnetje omtrent protocollen die aangepast worden bij andere species lijkt evident en hoeft niet benoemt in het project proposal (mogelijk eerder verwarrend). De volgende zinnen zouden kunnen blijven staan: *In case of the use of genetically modified animals, this requirement should be justified. If multiple rodent/non-rodent species are considered appropriate for the aim of the study, the choice of species will be discussed with the AWB.*
Wij delen deze suggestie en hebben dit in de PVA aangepast.
2. Pagina 7 punt 4.3.4: Suggestie om deze zin aan te passen "Guidelines are the main driver of the steps/milestones in a study or package of studies". Hier zou minstens ook wetgeving genoemd moet worden, i.e. "Laws, regulations and guidelines are the main driver etc...".
Dank, we hebben deze aanbeveling overgenomen.

Appendix 1:

3. Hoofdstuk C, Re-use: Kan de VGH aangeven of re-use vaak voorkomt voor de studie welke worden uitgevoerd binnen appendix 1? In welke situaties komt dit voor?
Voor de studies in deze appendix is re-use eerder uitzondering dan regel. Nagenoeg alle studies kennen een –richtlijn gedreven- terminaal eindpunt. Condition- en dose range finding studies zonder terminaal eindpunt in non-rodents, komen in aanmerking voor hergebruik.
4. In Table 2 zijn bij de repeated dose 18-24 months studies health check animals meegenomen. Kan de VGH aangeven waarom deze health check animals binnen deze PVA vallen?
Het gebruik van 'health checks animals' in dergelijke chronisch/carinogeniteits studies is nodig om mogelijke externe invloeden op de gezondheid van de studiedieren over langere tijd te monitoren. Dit is een internationaal geaccepteerde/gehanteerde aanpak en wordt in de Felasa richtlijn onderstreept.

Appendix 2:

5. Pagina 3 *Confinement and restraint*: De tekst over confinement voor 4 of 10 weken is onduidelijk. Heeft dit betrekking op ratten en konijnen en wat is het effect op ongerief? Het punt is dat niet meer helder is over welke diersoorten het hier gaat. Ratten of konijnen worden niet 4 of 10 weken in een metabolisme kooi gezet of wel? Consequentie is dat het ongerief van de dieren die ingezet worden niet goed is in te schatten. Als het om honden zou gaan waar dagelijks mee gespeeld wordt en die elkaar kunnen zien en horen, dan is het beeld duidelijk en kan het ongerief redelijk worden ingeschat. Ditzou wel op te lossen zijn door er iets over toe te voegen, over verschillen tussen species. Graag duidelijk aangeven wanneer de 4 weken geldt en wanneer de 10 weken, voor welke species, en waar de duur op gebaseerd is.
De tekst is op dit punt aangepast, met verduidelijking naar diersoort. NB. Dieren die solitair worden gehuisvest staan wel altijd op andere wijze in contact met elkaar (zien, horen, ruiken) zoals aangegeven onder F: huisvesting.
6. Pagina 4, B The animals – age and sex: Hier worden juvenile studies genoemd, maar die lijken onderdeel van Appendix 1?
Dit is een terechte constatering. Het voorbeeld 'juvenile studies' is uit deze Appendix (2) verwijderd.
7. Pagina 7, Onder de tabel, punt 5: Er staat: *In case in-house mating is used instead of time-mated animals, for some study types additional animals are needed to ensure sufficient number of successfully mated females at study start.* Voor de ethische afweging maakt het niet uit waar die matings

3 augustus 2017

plaatsvinden en daarom kan punt 5 weggelaten worden.

Dit advies is opgevolgd; tekst is weggehaald.

8. Page 7 C Re-use: Het lijkt de DEC dat ratten en konijnen zelden hergebruikt worden, zeker pups. Kan de VGH hier een toelichting op geven?

In de praktijk is er wel enige regelmaat sprake van hergebruik bij ratten. Dit betreft specifiek de 8 extra vrouwtjes uit de OECD 421 en 422 studies. In dit type studie worden van 48 dieren gedurende 2 weken vaginale spoelingen gemaakt om de estrus cyclus te bepalen. Op basis van de resultaten worden 40 vrouwen geselecteerd met een regelmatige cyclus. De overige 8 vrouwen kunnen hergebruikt worden voor bijvoorbeeld dose range finding studies.

9. Page 7 tweede alinea: Hier wordt de reliability check genoemd. Mogelijk horen deze bij de acute studies die vallen onder Appendix 1. Wat is het doel van de reliability check binnen een reproductie? Zou dit niet weggehaald moeten worden?

Binnen 'Appendix 2' wordt hiermee bedoeld op een checks voor gedragsonwikkelingsstudies om de validiteit van bepaalde metingen/testen te kunnen garanderen (d.i. gedragstesten, histopathologie en morfologie van de hersenen). Dit is een vereiste voor het accepteren van de studies door de autoriteiten. Dit is verduidelijkt in de aanvraag door (nieuw) punt 5 op pagina 7 en deels verwijderd van tekst in laatste alinea.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.e. en g

**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

10.2.e. en g

Bijlagen

3

Datum 12 oktober 2020
Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e. en g

Op 5 augustus 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods" met aanvraagnummer 10.2.e. en g. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf de datum van deze brief is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. De vergunning is afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

Op dit project is een beoordeling achteraf van toepassing. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

Procedure

Datum:
12 oktober 2020
Aanvraagnummer:
10.2.e.en.g

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 10.2.e.en.g DEC (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 14 september 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 2 oktober 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op een overzicht van de aantallen dieren per Bijlage Dierproeven. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Aanvullende opmerkingen

Onderzoeken waarvoor een in de EU geaccepteerd dierproefvrij alternatief beschikbaar is, er meer dieren, meer ongerief of op andere wijze uitgebreider getest moeten worden dan de Europese richtlijnen voorschrijven, vallen buiten deze vergunning. Voor experimenten die dit betreft kunt u een wijzigingsverzoek indienen.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d van de wet. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 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 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Datum:

12 oktober 2020

Aanvraagnummer:

10.2.e.eng

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2.e.eng

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

10.2.e.en g
10.2.e.en g

deze wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "In vivo studies to enable and support regulatory testing programs for the safety evaluation of medicinal products, chemicals, plant protection products, biocides, medical devices, feed and foods" met aanvraagnummer 10.2.e.en g, na advies van dierexperimentencommissie 10.2.e.en g DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Study Director Environmental Sciences.

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 5 augustus 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 14 september 2020;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 General Toxicology, zoals ontvangen op 14 september 2020;
 - 3.4.4.2 Developmental and Reproductive Toxicology, zoals ontvangen op 14 september 2020;
 - 3.4.4.3 ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) and DMPK (Drug Metabolism Pharmacokinetics), zoals ontvangen op 14 september 2020;
 - 3.4.4.4 Ecotoxicology, zoals ontvangen op 14 september 2020;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 14 september 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 14 september 2020
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 6 oktober 2020.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief	Overige opmerkingen
3.4.4.1 General Toxicology				De dieren van bijlagen 3.4.4.1 t/m 3.4.4.3 zijn in de vergunning opgenomen onder bijlage 3.4.4.1. Verdeling van de dieren over de verschillende bijlagen is weergegeven in de tabellen in de bijlage bij deze vergunning.

10.2 .e. en g

	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	22.500	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	190.000 / 256.000	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	
	Syrische goudhamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>)	200	1,0% Ernstig 49,0% Matig 50,0% Licht	
	Cavia's (<i>Cavia porcellus</i>)	1.600	1,0% Ernstig 49,0% Matig 50,0% Licht	
	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	22.250 / 62.500	5,0% Ernstig 50,0% Matig 45,0% Licht	
	Honden (<i>Canis familiaris</i>)	2.600	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	
	Katten (<i>Felis catus</i>)	750	1,0% Ernstig 49,0% Matig 50,0% Licht	
	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	1.200	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	
3.4.4.2 Developmental and Reproductive Toxicology				
3.4.4.3 ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) and DMPK (Drug Metabolism Pharmacokinetics)				
3.4.4.4 Ecotoxicology				
	Klauwkikkers (<i>Xenopus laevis</i> en <i>Xenopus tropicalis</i>)	2.750 / 10.800	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	

Aanvraagnummer:

10.2 .e. en g

	Andere vissen (andere Pisces) / meerdere soorten	22.000 / 30.000	5,0% Ernstig 45,0% Matig 50,0% Licht	
--	---	--------------------	--	--

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

Op dit project is een beoordeling achteraf van toepassing. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2023 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, tweede lid 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:

10.2 .e. en g

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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 verdooving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving 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

Aanvraagnummer:

10.2 e. en g

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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, eerste lid onder d en derde lid 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.



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for 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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- 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.

Cancer is a leading cause of death worldwide, accounting for 8.8 million deaths in 2015 with an estimated 16 million new cases of cancer in 2016 (World Health Organization; www.who.int). Cancer is a

generic term for a large group of diseases that can affect any part of the body. It is defined as the abnormal growth of a cell population beyond its usual tissue context with the potential to spread to other parts of the body. The spreading of cancer cells from the primary tumor to distant sites in the body (metastases) is the major cause of death of cancer.

Cancer is nowadays recognized as a disease of the DNA: through the acquisition of genetic or epigenetic alterations affecting the functioning of oncogenes and tumor suppressor genes, cancer cells have acquired limitless proliferative capacity often leading to the outgrowth of tumors outside the tissue of origin. In-depth knowledge of the underlying molecular and cellular mechanisms of cancer is imperative to develop novel strategies to prevent and manage the disease with the aim of cure or long-lasting control. The uncontrolled proliferation of cancer cells relies on a number of cell intrinsic characteristics that can partially be studied in cell culture and include: self-sufficiency in growth factors; insensitivity to anti-growth signals; evasion of apoptosis; maintenance of telomeres; genomic instability and therapy resistance. However, an equally important determinant of the cancerous state is the cellular environment of tumor cells, which includes the level of angiogenesis; the tumor microenvironment and normal-tissue-surrounding of invading and metastasizing tumor cells; and the interaction with the immune system. These tumor-cell-extrinsic characteristics only manifest in the context of a complete organism. It should be noted though that characteristics that were identified and studied in cell culture and hence be considered cell-intrinsic, can be influenced by the cellular environment and therefore often manifest differently within the context of an organism. Therefore, the use of appropriate model organism is imperative to understand tumor development and progression, its disseminating capacity and its response to therapeutic intervention.

The first cancer genes were identified in viruses that upon infection caused cancer in chicken and mice. Additional oncogenes and tumor suppressor genes have been identified by genomic profiling of human tumors and by gain and loss-of-function screens aimed at identifying genetic alterations that can drive the transformation of a normal cell towards a cancer cell. Such screens have been performed both in cell culture and in mouse models. More recently, advanced sequencing technology has detected recurrent genetic alterations in fresh tumor material and tumor-derived cell lines and organoids and much of these data are publicly available (e.g., TCGA data and ICGC cancer genome projects).

To study how genetic alterations affecting the activity of oncogenes and tumor suppressor genes impact on tumor development and behavior, animal models are imperative. Traditionally, tumors in mice or rats were induced by exposure to carcinogens or by or retroviral infection or activation, and these approaches are still in use. In addition, our institute has a longstanding expertise in generating and studying genetically modified mouse strains that have been used to produce a variety of genetically engineered mouse models (GEMMs) in which tumors develop that closely resemble human cancer. An example is the successful development of a GEMM for BRCA1-deficient breast cancer. BRCA1 is the most important breast cancer susceptibility gene in high-risk families, contributing to approximately half of all familial breast cancer cases. BRCA1-associated breast cancers do not express hormone receptors and HER2/ERB2 and can therefore not be targeted with endocrine agents or HER2 targeting therapeutics. Consequently, BRCA1-associated breast cancer patients have a relatively poor prognosis. Our BRCA1-deficient mouse model has strongly contributed towards a better understanding of genotype-phenotype correlations in BRCA1-associated breast cancer and confirmed the potential anti-tumor efficacy of PARP inhibitors. Also mechanisms of escape from PARP inhibitors have been discovered. This model will help us find and test new therapeutic targets, which in combination with PARP inhibitors may overcome resistance and lead to complete cure. The BRCA1 model is only one of many that demonstrates the relevance and successful use of mouse models to study cancer development and progression.

It should be noted that also genes exist that are not oncogenic themselves, but cooperate with oncogenes to impact cancer development and progression. Examples are integrin genes that encode a family of cell-matrix adhesion receptors. Integrins are often overexpressed in cancer and using our GEMM for Itga3-deficient skin cancer we showed that ablation of integrin $\alpha 3$ reduced skin tumorigenesis.

This suggests that some oncogenes require integrin signaling for their ability to initiate tumor growth and invasion. This integrin-deficient mouse model made us aware that we can also find therapeutic targets in genes that are not considered cancer genes themselves, but contribute to oncogene-activity.

Recent developments in embryology and genetic engineering technology has also made the rat accessible to genetic modification, allowing the generation of genetically engineered rat models (GERMs). For certain types of tumor modelling, rats are preferred over mice.

Besides autochthonous tumor models, *i.e.*, chemically or retrovirally-induced tumor models and genetically modified animals with an increased susceptibility of developing tumors from specific tissues, or a combination thereof, patient-derived xenograft (PDX) models become increasingly important. In these models, patient-derived tumors are (orthotopically) implanted in immunocompromised animals in such a way that they maintain their original growth characteristics. Examples are recently developed sarcoma PDX models (such as radio-sensitive myxoid liposarcoma and other histological subtypes) that will be used to develop novel preoperative radiotherapy regimens.

In this project, we will develop and extensively characterize novel mouse and rat tumor models in order to advance our understanding of the impact of individual oncogenes and tumor suppressor genes on tumor cell development and behavior and its dependence on the genetic status of non-cancer genes and environmental factors. Translation of *in vitro* data to the *in vivo* setting of appropriate animal models is an essential step in the development of novel treatment modalities that allow cure or long-term control of human cancer.

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?

Our aim is to develop, characterize and validate mouse and rat models of cancer that provide experimental access to the cellular and molecular biology of cancer in the context of a living organism. These models are imperative to provide us with a better understanding of how mutations or epigenetic alterations in oncogenes and tumor suppressor genes, in a context of non-cancer genes, impact critical aspects of tumor biology, such as the development and progression of cancer and the process of metastasis formation. After their development and thorough characterization, these animal models will be used for the validation of new potential drug targets and for investigating how the tumor microenvironment and genetic and environmental factors impact on tumor development and behavior. We will also investigate how cancer cells can adapt to a hostile environment, *e.g.*, created by established therapeutic intervention regimens.

In the current project we will make use of genetically-modified (GM) mouse strains that have been generated in the context of CCD-approved project "Generation and cryopreservation of genetically-modified mouse strains" and characterized under CCD-approved project "Functional analysis of genes implicated in cancer". The mouse tumor models developed in the current project will be used for testing and optimizing novel prevention and intervention strategies in the context of the CCD application "Pre-clinical intervention studies in mice for prevention and treatment of cancer". In addition we will generate transplantation and somatic tumor models in mice and rats.

The key issues we want to address in the present application are:

1. Modeling human cancer

What are the requirements to accurately mimic human cancer in an animal model? What are the resemblances, what the differences?

2. The biology of cancer

Which are the cells-of-origin of cancer in different models? Can we mimic tumor heterogeneity, tissue invasion and metastasis?

3. Cancer genes

What is the role of (candidate) oncogenes and tumor suppressor genes in tumor formation and progression? Can we identify and validate novel cancer genes and genes that influence the activity of cancer genes?

4. Drug targets

What are the vulnerabilities of cancer cells? Are they addicted to certain cancer or non-cancer genes or processes? What is their role in tumor development and tumor maintenance? Can they be targeted and can this be used for therapeutic intervention?

5. Microenvironment

How are tumor development and progression influenced by the tumor microenvironment (e.g., cancer-associated fibroblasts, infiltrating immune cells)? And conversely, how is the tumor microenvironment influenced by cancer cells to promote tumor growth?

6. Environmental factors

How are tumor development and progression influenced by environmental factors (e.g., diet, microbiome, day/night rhythm, viruses, carcinogens or other regimens)? Can we identify tumor preventive conditions?

7. Genetic factors

How are tumor development and progression influenced by genetic factors (e.g., mutations in DNA repair genes; RNA transcription and translation; innate/adaptive immunity; metabolism; hormone production)?

8. Biomarkers

Can we identify prognostic and predictive biomarkers that predict the course of tumor development and response to therapy?

9. Tumor adaptation

How do cancer cells manage to survive and proliferate in a hostile environment?

Our institute provides an excellent environment to achieve the research purposes formulated above. Being a comprehensive cancer center, state-of-the-art patient care and fundamental, translational and clinical cancer research are all combined in a single independent organization. Our research laboratory covers all major areas of oncology research, with a longstanding emphasis on the molecular and cellular biology of cancer, tumor immunology and mouse tumor models. The institute has excellent core facilities, including confocal and digital microscopy and flow cytometry, a robotics facility for cell-based screens, a genomics core facility for DNA copy number analysis and next-generation RNA and whole-exome and -genome sequencing of tumor samples, and a large bioinformatics group with dedicated statisticians. Most importantly, 2016 has seen the opening of a brand new animal facility (capacity 20,000 cages) with state of the art animal housing conditions and supported by an expert transgenic core facility for the generation of genetically engineered mice. An animal pathology facility with dedicated technicians and animal pathologists ensures the highest level of post mortem animal examination.

3.3 Relevance

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

Scientific:

This project will provide novel insight into the process of cancer initiation and progression and many other aspects of tumor biology. A better understanding of the interplay between perturbations of different cellular pathways is crucial for the development of new therapies. Besides *in vitro* identification and validation of potential cancer genes and drug targets, it is essential to characterize and validate these genes/targets *in vivo* where the tumor microenvironment may alter the consequences of oncogenic alterations and the behavior of transformed cells, including their response to therapy.

Social:

Cancer is a serious disease associated with severe morbidity and high mortality. The Dutch Cancer Registry (<http://www.cijfersoverkanker.nl/>) reported 104,649 new cancer cases and 43,214 cancer-related deaths in 2014 in the Netherlands. Although the considerable progress that has been made in clinical management of cancer has significantly improved the cure rate over the past two decades, the absolute number of cancer deaths is still increasing. To reduce the burden on society and individuals confronted with the disease, novel therapeutic interventions are urgently needed.

The mouse models developed, characterized and validated in this project will be used to study new therapies to prevent or defeat cancer. Thorough testing of novel (therapeutic) prevention and therapeutic intervention strategies in validated preclinical models is a crucial step to improve the clinical management of cancer.

3.4 Research strategy

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

In our institute, extensive expertise exists in the generation and characterization of genetically modified (GM) mouse strains. GM mice generally carry a single genetic alteration, *e.g.*, a disruption of a gene, or a transgene tissue-specifically expressing an oncogene or Cre recombinase. These activities are covered by two separate CCD applications.

The present CCD application deals with the development, refinement and in-depth characterization of mouse and rat models for human cancer in order to uncover the molecular and cellular mechanisms that underlie the development and progression of cancer and to provide reliable models to study novel therapeutic interventions. The ultimate aim is to find effective strategies to defeat the disease. The actual testing of novel therapeutic strategies will be performed under a separate CCD application: "*Pre-clinical intervention studies in mice for prevention and treatment of cancer*".

Fig. 1 depicts the overall design of the project with the two classes of cancer models highlighted in red. The starting point is human cancer. **Transplantation models** allow human tumors to expand in the corresponding murine environment (patient-derived xenograft, PDX models) where they maintain their original growth characteristics thus providing a reliable readout for therapeutic interventions. Also (briefly) *in vitro* cultured human tumor cells (organoids, cell lines) may be used as xenografts. At the same time, genomic profiling and sequencing of human tumors, combined with experimental cancer gene discovery and validation (mostly through the use of cell culture systems), provides an increasing list of candidate cancer genes and genes that are essential for the survival of cancer cells, which may provide novel potential drug targets. Validation of these genes involves the development of **spontaneous models** through germ-line and somatic genetic engineering. Tumor progression and behavior can be studied directly in spontaneous models or in transplantation models upon implantation of murine tumor material (murine-derived allograft; MDA models). In each of the models, the different stages of tumor development will meticulously be monitored to define the cell of origin and pre-neoplastic, neoplastic, invasive and metastatic stages. Monitoring involves methods for *in vivo* imaging of tumor growth, intravital microscopy and *post-mortem* examination. Finally, conditioning of tumorigenesis entails the identification and validation of environmental and genetic conditions that impact tumor development and behavior, and is ultimately aimed at the refinement of tumor models. Careful characterization and refinement are mandatory to complete our insight into the development of cancer and to validate the models for subsequent use in prevention and intervention studies.

While this scheme is centered around the modelling of cancer in mice, it has become clear in recent years that in some cases mouse models are not appropriate for answering our research questions and that rats may provide a more accurate model for certain types of human cancer.

Examples where rats are preferred are:

- Hormone dependent cancers: hormone levels in rats are comparable to those in humans, whereas hormone levels in mice are much lower. Consequently, early stage hormone-dependent breast cancer (*e.g.*, ductal carcinoma in situ) cannot be modelled in mice, even with s.c. placement of hormone pellets.

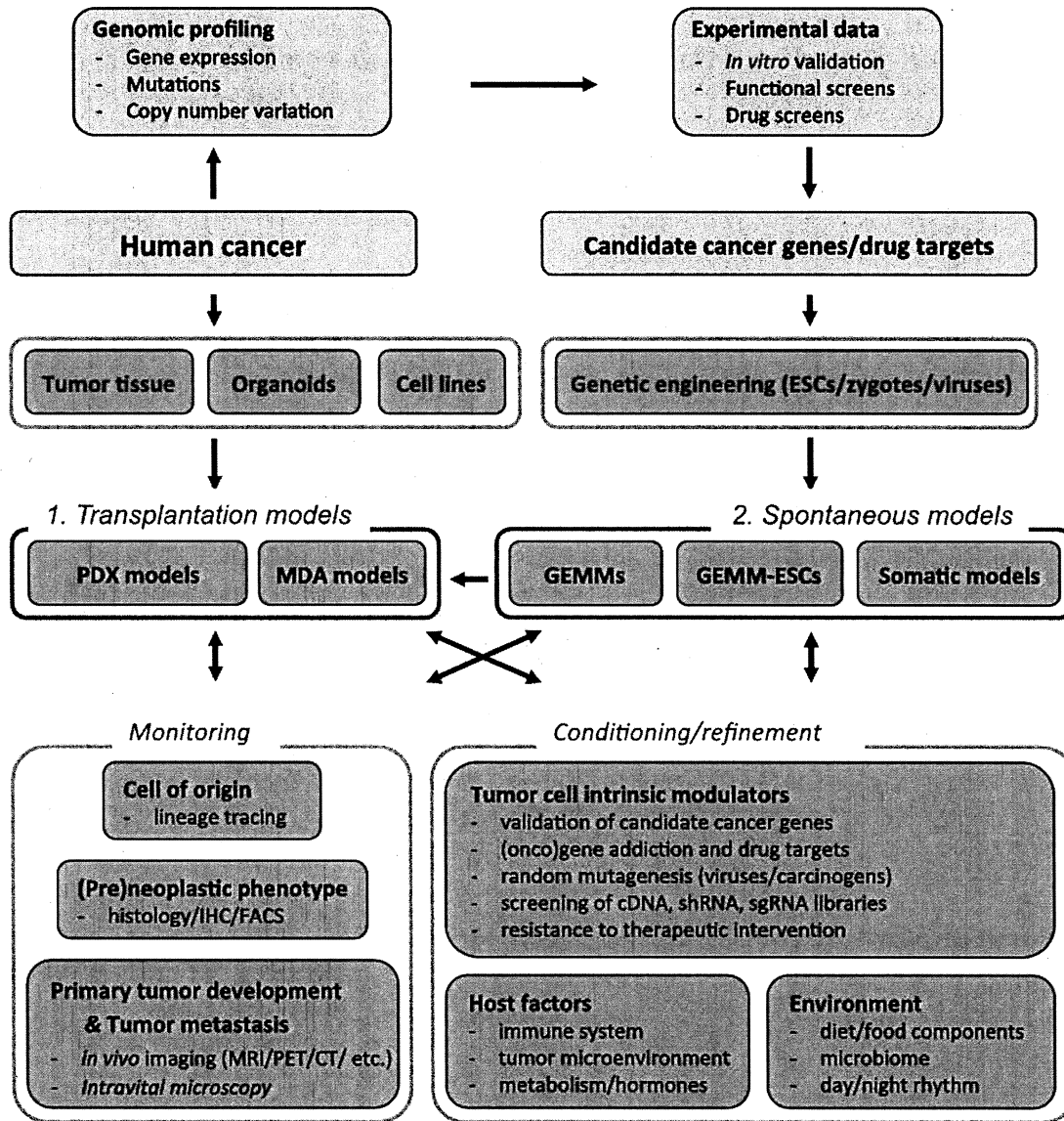
- Research into brain tumor heterogeneity using imaging techniques: due to the small size of the murine cranium, a lethal brain tumor in mice can reach a diameter of only 3-4 mm, which is too small to obtain enough resolution for imaging. Rat brain tumors will be proportionally larger.

Besides mouse models, we will therefore in selected cases also generate transplantation and spontaneous tumor models in rats.

The two classes of murine cancer models as well as approaches of monitoring and conditioning are described in more detail in appendices 01 and 02. The transplantation and spontaneous rat tumor models are described in appendices 04 and 05, respectively.

Our institute provides the optimal infrastructure for performing each of the components of this project. We have been at the forefront of several key innovations in mouse cancer genetics critical for the production of genetically engineered mouse models (GEMM) for cancer, such as development of conditional knockout technology and the establishment of the GEMM-ESC technology. The latter involves derivation of murine embryonic stem cells (ESCs) from established GEMMs and their subsequent genetic modification, after which they are injected into recipient blastocysts to generate cohorts of tumor prone chimeric mice. The GEMM-ESC approach permits rapid *in vivo* analysis of candidate cancer genes and allelic variants. Most recently, CRISPR/Cas9-mediated gene modification technology in ESCs and zygotes has been implemented. CRISPR/Cas9 technology has also successfully been used to induce tumor development somatically, providing an attractive but yet to be optimized and validated alternative for germ-line engineering.

Fig. 1. Generation and characterization of new mouse models of cancer



To facilitate the development of GEMMs, somatic tumor models and PDX/MDA models, and their application in preclinical tumor intervention studies, we have established a Mouse Clinic for Cancer and Aging research (MCCA), supported by an infrastructural grant from the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO).

Current and future GEMMs (or GERM) and somatic, PDX and MDA models will be used to study tumor development originating from any tissue, such as skin, breast, lung, thorax, stomach, colon, small intestine, liver, kidney, bladder, prostate, ovary, uterus, muscle, fat, bone, cartilage, hematopoietic and vascular tissue and brain.

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.

The two different classes of tumor models to be used in this project are highlighted in red in Fig. 1 and are described in appendices 01 and 02 for mice and 04 and 05 for rats.

1. Transplantation models

The implantation of human tumor-derived cell lines in immune-compromised mice has a long history and has been (and is still) widely used to study responsiveness of human tumor cells to (chemo)therapeutic intervention. However, because tumor cell lines have often extensively been cultured *in vitro* and are usually implanted subcutaneously, these classical xenograft models do often poorly recapitulate the characteristics of the original human tumor and hence, results obtained with these models have only limited clinical value.

Most recently, more reliable models have been obtained by implanting fresh human tumor material yielding so called patient-derived xenograft models. Also murine tumors can be expanded upon implantation in recipient animals.

a. Patient-derived xenograft models (PDX)

As in classical xenograft models, human-tumor-derived material is implanted in immune-compromised recipient mice to avoid a host versus graft response. The xenograft is derived from a fresh human tumor biopsy and can be implanted in commonly used sites (subcutaneously, under the kidney capsule, intravenously, intraperitoneally) or orthotopically, *i.e.*, in an environment that resembles the original site of origin in the patient. *E.g.*, a mammary tumor piece is surgically implanted into the mammary fat pad of the recipient mouse. This ensures molecular, genetic and histological characteristics of tumor growth are maintained, even after consecutive passaging *in vivo*.

Alternatively, rats can be used as recipients.

In this way, human tumor banks can be created that allow comparing the growth behavior and therapy response of a particular tumor type and its subtypes from different patients.

For some tumor types, successful grafts have been obtained from circulating tumor cells in blood or bronchial or abdominal fluid. In some applications, tumor-derived cells are (briefly) cultured *in vitro* as organoids or cell lines and can be genetically modified before implantation.

Also genetically-modified normal or precancerous cells or organoids can be used. An example is the implantation of genetically-modified normal gastric organoids in the gastric mucosa of recipient mice by electrocoagulation yielding a model for gastric cancer.

An obvious limitation of PDX models is that pro- and anti-tumorigenic effects of the immune system cannot be properly recapitulated.

b. Murine-derived allograft models (MDA)

(Orthotopic) implantation of murine-derived tumor material (*e.g.*, directly from a GEMM/GERM or from a tumor cell culture) allows the generation of large cohorts of identical tumor-bearing animals that can reliably be used for intervention studies. Subsequent surgical removal of resulting tumors may allow studying the outgrowth of distant metastases. Another option is to surgically remove metastases that developed after *e.g.* intravenous injection of tumor cells or ectopic transplantation of tumor cells, to enable studying (re)growth of metastases. An important advantage of these models is that immune-competent syngeneic recipients can be used giving experimental access to the role of the host immune system in tumor growth, metastatic behavior and therapy response.

Grafts may also consist of genetically-modified normal cells or organoids. *E.g.*, the repopulation capacity of genetically-modified bone marrow cells in irradiated mice may provide a readout for oncogene/tumor suppressor gene activity.

2. Spontaneous models

The word 'spontaneous' indicates that tumors arise from tissues of the animal itself after stochastic acquisition of oncogenic events. An alternative term is therefore 'autochthonous models'. To accelerate this spontaneous process, mice or rats can be exposed to carcinogenic regimens such as carcinogenic compounds or viruses that can modify the activity of oncogenes and tumor suppressor genes. More sophisticated models make use of genetically-modified mice that already carry or have a high propensity to acquire oncogenic genetic alterations. Four distinct models exist:

a. Genetically engineered mouse models (GEMMs)

In its simplest form, mice are genetically modified to over-express a single oncogene in a particular tissue, or to carry a defective allele of a tumor suppressor gene, thus sensitizing the animal to tumor development. Examples of models we previously developed are the Eμ-Pim1 model in which the *Pim1* oncogene is over-expressed in hematopoietic tissues leading to development of T-cell lymphomas, and *Rb1*^{+/-} mice that upon spontaneous loss of the wild-type allele of the retinoblastoma gene (*Rb1*) develop pituitary gland tumors.

The implementation of conditional knockout technology (e.g., the Cre-*loxP* or Flp-*FRT* recombination systems) allows spatial and temporal control over oncogene activation and tumor-suppressor gene inactivation and hence induction of tumor development in specific tissues. Examples are the previously mentioned breast cancer model in which 'floxed' alleles (i.e., essential exons are flanked by *loxP* sites) of *Brca1* and *p53* are inactivated through tissue-specific (in this case under control of the K14 promoter) expression of Cre recombinase, and a small-cell-lung cancer model where conditional *Rb1* and *p53* alleles are inactivated in the epithelial lining of the lungs through inhalation of a Cre-expressing adenovirus. Spatiotemporal control over gene activation/inactivation can also be achieved by using Cre-*ERT2* fusion genes that encode an inducible Cre protein that needs to be activated by administration of the estrogen analog tamoxifen. Also doxycycline-inducible gene expression systems can be used for timely expression of Cre, an oncogene or an shRNA targeting a tumor suppressor gene. In the case of a light-inducible Cre recombinase, exposure to light of the necessary wavelength to the tissue(s) of interest will activate Cre.

Due to recent developments in embryology and genetic engineering, similar approaches are now feasible in rats.

b. Embryonic-stem-cell-derived GEMMs (GEMM-ESC)

Cohorts of cancer-predisposed animals can also be generated through injection of genetically-modified mouse embryonic stem cells (ESCs) into blastocysts from wild-type animals. As ESCs can contribute to virtually every tissue, the resulting chimeric animals consist for a large part of genetically-modified cancer-prone cells and therefore have a high propensity to develop a tumor. This approach presents the opportunity to study genetic events that are incompatible with embryonic development in a conventional crossing, but are tolerated in a chimeric setting where development is rescued by the presence of wild-type cells. A great advantage is that additional genetic conditions that impact tumor development can easily be introduced in ESCs. This allows relatively rapid validation of candidate cancer genes. The first example of this approach was the generation of *Rb1*^{-/-}*p107*^{-/-} chimeric mice that developed retinoblastoma. More recently, this approach has received a strong impulse by the improvement of protocols to derive ESCs from existing complex GEMMs that can be further modified *in vitro* (e.g., by using CRISPR/Cas9 technology) and be used to generate cohorts of cancer-prone chimeric mice.

c. Somatic models

The most traditional way of inducing cancer in laboratory animals is through exposure to carcinogenic compounds like ENU or DMBA, or through infection with oncogenic viruses such as MMTV, RMTV or MoMLV, in order to randomly mutagenize the genome.

More recently, the development of CRISPR/Cas9-mediated genome technology has presented the opportunity of targeted mutagenesis, which allows modulating the activity of predefined cancer genes in somatic tissues in adult animals. In most cases, viral vectors are used to deliver CRISPR/Cas9 components to specific tissues, but also other tools can be used such as tattooing for dermal delivery of naked DNA or protein. Also local deposition is possible of a cell line excreting infectious particles carrying CRISPR/Cas9 components. Similarly, shRNA or expression vectors can be somatically delivered to induce tumorigenesis. This approach obviates the need for complex and time-consuming genetic modification of the germ line and has yielded novel models for liver, pancreatic, brain and breast cancer. However, to avoid an anti-tumor immune response, in certain applications immune-compromised or Cas9-tolerant mice or rats must be used.

Somatic gene modification can be facilitated by using genetically-modified recipient animals. *E.g.*, transgenic mice already expressing Cas9 only require site-directed delivery of specific sgRNAs to achieve the desired tumor suppressor gene disruptions. Conversely, transgenic mice have been generated expressing an array of sgRNAs targeting specific genes. Gene modification now only requires tissue-specific delivery of a Cas9 expression vector. Also local delivery of Cre recombinase or application of tamoxifen to locally activate a Cre-ERT2 transgene can be used. The CRISPR/Cas9 system can be used for targeted gene disruption, but also modifications have been developed allowing inducible and reversible gene activation (CRISPRa) and repression (CRISPRi).

d. Carcinogen-induced tumor models

Tumors in laboratory animals can be induced by exposure to carcinogenic regimens, such as exposure to carcinogens like DMBA/TPA to induce skin tumors, DMH (intestinal tumors), ENU/MNU (lymphomagenesis), or infection with retroviruses like MMTV or RMTV (breast tumors) and MoMLV (lymphomas). Instead of infection, tumor induction can also be achieved by activation of endogenous retroviruses. These models are still in use and may be expanded in studies addressing the carcinogenic risks or deleterious side effects of chemotherapeutic interventions, which also may include irradiation.

The development of spontaneous models, in particular GEMMs and GEMMs-ESC, requires extensive crossings of genetically engineered mice (GM) mouse lines carrying specific genetic modifications. For *transplantation models*, in particular MDA models, recipient animals may be needed that carry the same genetic background as the allograft, which may require extensive backcrossing. Thus, for maintenance and backcrossing of GMs, a breeding program is required. When the genetic modification has phenotypic consequences causing distress, this will be performed under a **breeding-with-discomfort** protocol that is described in appendix 03.

Each novel tumor model needs careful characterization and refinement before it can be used in prevention and intervention studies. Characterization involves **monitoring** the dis-, hyper- and neoplastic lesions that develop and their progression into a primary tumor and distant metastases. Lineage tracing experiments will be performed to confirm or identify the cell of origin of tumor development. Besides information on time of onset and speed of tumor growth, an important question to be addressed here is: to which extent does the model recapitulate the corresponding tumor type in humans? To this aim, tumor initiation, progression and metastasis formation in transplantation and spontaneous mouse and rat models will be closely monitored by different imaging techniques in living animals as well as by in-depth *post mortem* examination. Information on tumor development will also be obtained from regular collection of blood samples that are analyzed for immunological parameters and biomarkers.

Finally, **conditioning** entails the identification and study of environmental and genetic conditions that impact tumor development with the aim to refine tumor models for subsequent optimal use in prevention and intervention studies. These conditions are divided in (1) tumor-intrinsic and (2) tumor-extrinsic factors.

(1) Tumor-intrinsic factors. By additional genetic modification in transplantation or spontaneous models, *candidate* cancer genes will be validated and possible vulnerabilities of cancer cells will be studied. The latter involves addition of cancer cells to certain oncogenic events or to pathways that are not oncogenic themselves but have become critical in cancer cells. Such genes or pathways may provide novel targets for therapeutic intervention.

Novel cancer genes will be identified by *ex vivo* (in transplantation models) or *in vivo* (in spontaneous models) random or targeted mutagenesis. In transplantation models, grafts can easily be subjected to random mutagenesis by exposure to chemical mutagens, viral oncogenic regimens, or insertional mutagens such as retroviruses or transposon-based systems. Targeted mutagenesis can be achieved by delivery of cDNA, shRNA or sgRNA libraries, the latter in combination with Cas9 or one of its variants. Also in spontaneous models, mutagenesis protocols can be applied. *E.g.*, insertional mutagenesis by

retroviral or transposon systems like Sleeping Beauty, either delivered through the germ-line or somatically, can identify oncogenes and tumor suppressor genes whose expression/extinction influence a certain aspect of tumor development and behavior.

By these screening approaches, genetic events may be identified that promote (or inhibit) tumor growth not only in the normal context of the living animal but also in a *hostile* environment artificially created by chemo-, radio-, or immunotherapeutic regimens.

(2) Tumor-extrinsic factors. Host-specific factors impacting tumor development and behavior include the tumor micro-environment (cancer-associated fibroblasts, tumor-infiltrating immune cells), systemic effects of the immune system, metabolism and hormone/cytokine production. These factors can be modulated genetically, *e.g.*, by using genetically-modified mice as recipients in transplantation models or as blastocyst donors in GEMM-ESC models. The tumor micro-environment can also be modulated by targeted or random mutagenesis. *E.g.*, a population of T-cells, derived from donor mice, can be mutagenized gene-specifically or with a library and subsequently be used for adoptive T-cell therapy to create a hostile tumor environment.

The tumor macro- and micro-environment can also be modulated through the diet, alteration of the microbiome or administration of antibodies that neutralize certain (hematopoietic) cell types.

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.

Animal models for human cancer can be divided in (1) transplantation models in which human or murine tumor material is implanted in recipient animals in such a way that original tumor characteristics are maintained, and (2) spontaneous models in which animals develop autochthonous tumors after exposure to carcinogenic regimens or germ line or somatic gene modification. These models are described in appendices 01 and 02 for mice and 04 and 05 for rats. For both models, GMs may be required that are maintained and crossed in a *breeding-with-discomfort* program, described in appendix 03. Besides the development of the models *per se*, appendices 01, 02, 04 and 05 have two additional critical components: *monitoring* and *conditioning*. *Monitoring* is aimed to provide a detailed description of the different steps of tumor development, ranging from the identification of the cell of origin to the development of distant metastasis. It can involve a range of non-invasive *in vivo* imaging techniques (CT, PET-CT, MRI, Ultrasound, Bioluminescence), collection of blood samples or tumor biopsies, and *post mortem* macro- and microscopic examination of tumor and normal tissue. A subset of animals will be examined by *intravital* microscopy techniques, either under terminal anesthesia, *i.e.*, the animal will be euthanized after image collection, or under recovery anesthesia when images at sequential time points are required. Ultimately, all animals will be euthanized and subjected to *post mortem* examination through histology and biochemical analyses of collected material. *Conditioning* is aimed at the refinement of models by studying genetic and environmental modifiers of tumor development and by identifying and validating candidate cancer genes, drug targets and therapy-resistance mechanisms.

As depicted in Fig. 1 the components of the project are intimately intertwined. Autochthonous mouse or rat tumors can be used in transplantation models to yield cohorts of identical tumor bearing animals that can be used for intervention studies. Also, gene modification technologies developed and exploited for the development of spontaneous tumor models is used for genetic modification of specific genes in transplantation models. Transplantation and spontaneous models will be characterized by similar imaging techniques; environmental factors affecting tumor growth can be studied in both models. Also modification of certain host factors (such as immune system, hormone production) may impact tumor growth in both transplantation and spontaneous models.

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	Transplantation models: grafting of human and mouse-derived tumor tissue

2	Spontaneous models: cancer susceptibility by germ-line or somatic gene modification
3	Breeding with discomfort of genetically-modified mice
4	Transplantation models: grafting of human and rat-derived tumor tissue
5	Spontaneous models: cancer susceptibility by germline or somatic gene modification in rats
6	
7	
8	
9	
10	

Dierexperimentencommissie NKI
Plesmanlaan 121
1066 CX AMSTERDAM
020-512 [REDACTED]
DEC@nki.nl



Centrale Commissie Dierproeven

3 juli 2017

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
2. Titel van het project: Development and characterization of new mouse models of cancer
3. Titel van de NTS: Het ontwikkelen en karakteriseren van muismodellen voor kanker
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer: AVD3010020172464
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC NKI
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.2 .e. en g [REDACTED] bereikbaar op 020-512 [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: DEC@nki.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 02-05-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 10-05-2017 en 02-06-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 19-05-2017/29-05-2017 en 08-06-2017/22-06-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag:
 - advies aan CCD:
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
 - Datum:
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:
 - Aanwezige (namens) aanvrager:
 - Gestelde vraag / vragen:
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum vragen: 19-05-2017 en 08-06-2017

Datum antwoorden: 29-05-2017 en 22-06-2017

- Gestelde vragen en antwoorden:
- De DEC heeft de aanvrager verzocht beter af te bakenen wat binnen dit project valt en wat niet en daarvoor consequent terminologie te gebruiken. *De aanvrager heeft daarop het antwoord op vraag 3.2 van het project gedeelte aangepast.*
- De DEC heeft de aanvrager verzocht in de beschrijving van de strategie meer aandacht te besteden aan de vraag welke experimenten in welke DAP's gebruikt worden in de verschillende componenten van de strategie en daar helder naar te verwijzen. *De aanvrager heeft dit in de aanvraag verwerkt bij 3.4.3 en 3.4.4.*
- De DEC heeft de aanvrager gewezen op tal van redactionele en inhoudelijke problemen in de bijlagen (onvolledig beantwoorde vragen, ontbreken van experimentele handelingen, humane eindpunten verhelderen en verwijzen naar de Code of Practice etc.). *De aanvrager heeft de aanvraag op al die punten herzien.*
- De DEC heeft de aanvrager met name aangespoord om zo duidelijk mogelijk aan te geven dat de tabellen in de bijlagen die de mogelijke experimentele handelingen aan de dieren beschrijven alleen iets zeggen over het ongerief als gevolg van de procedures (maximaal matig), en niet over de gevolgen van de tumorgroei (dit kan ernstig zijn). *De aanvrager heeft dit verduidelijkt.*
- De DEC heeft de aanvrager verzocht de NTS in te korten en enkele inconsistenties met de projectaanvraag en de bijlagen dierproeven op te heffen. *De aanvrager heeft dit gedaan.*

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De gevraagde wijziging is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een wijziging van een lopende vergunning.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Geen van de DEC-leden is betrokken bij deze projectaanvraag.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4b uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan.

Het kankeronderzoek, zowel in tumormateriaal van patiënten als in proefdieren, resulteert in de identificatie van grote aantallen genen en genetische elementen die betrokken zijn bij tal van vormen van kanker. De eerste stap die daarop volgt is fundamenteel onderzoek naar de functie van die genen in normale fysiologische omstandigheden. Voor dat doel worden doorgaans genetisch gemodificeerde muizenlijnen gegenereerd of geïmporteerd, waarin de geselecteerde genen veranderd tot expressie komen. Deze muizenlijnen worden gefenotypeerd en op basis van

de resultaten wordt een besluit genomen over de vraag of verder onderzoek naar de rol van de betreffende genen bij ontstaan en verloop van kanker en naar gerichte therapeutische interventies gerechtvaardigd is. Voor die eerste stap beschikt de aanvrager al over vergunningen.

De volgende stap is het bestuderen van het ontstaan en het verloop van kanker in voor dat doel ontwikkelde muismodellen (transplantatiemodellen en spontane modellen). Deze aanvraag heeft betrekking op die stap, waarin muismodellen voor kanker worden ontwikkeld, gekarakteriseerd en bestudeerd. Men concentreert zich daarbij op de vraag hoe verandering in oncogenen en tumorsuppressorgenen leiden tot ongelimiteerde celvermeerdering en uitzaaiingen en hoe deze processen worden beïnvloed door de micro-omgeving van de tumor, het metabolisme van het organisme en omgevingsfactoren. Verder komen daarbij vragen aan de orde als: welke genen in de tumor zijn essentieel voor tumorgroei (en vormen derhalve aangrijpingspunten voor nieuwe therapeutische interventies), en hoe worden kankercellen resistent voor anti-kanker therapieën? Het vinden van aangrijpingspunten voor therapie maakt dus nog onderdeel uit van deze aanvraag, maar het verder uitwerken en testen van mogelijke therapieën niet. Wel is het nadrukkelijk de bedoeling dat de modellen die onder deze aanvraag ontwikkeld en gekarakteriseerd worden, ook worden gebruikt om therapieën te testen onder een andere reeds verleende vergunning.

Deze aanvraag richt zich dus specifiek op het ontwikkelen van muismodellen voor kanker en het bestuderen van het verloop van het kankerproces in die modellen. Ontwikkelen, karakteriseren en bestuderen gaan hand in hand: karakteriseren en bestuderen maken deel uit van het proces van modelontwikkeling. Samen leveren ze ook informatie over mogelijke aangrijpingspunten voor therapieën en preventie. Ze zijn in de ogen van de DEC moeilijk te scheiden.

De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende de ontwikkeling en bestudering van elk model op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over voortzetting van het onderzoek met het betreffende model en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

Wijziging december 2020

Zoals aangegeven heeft dit project als hoofddoel om het verloop van kanker te bestuderen in voor dat doel ontwikkelde muis- en ratmodellen. De gevraagde wijziging heeft betrekking op bijlage 1 en 2 (de muismodellen). De aanvrager gebruikt twee typen modellen, die zich met name van elkaar onderscheiden door de wijze waarop ze worden geïnduceerd. In bijlage 1, bij de transplantatiemodellen wordt de tumor geïnduceerd door een stukje tumorweefsel dat is geïsoleerd uit een andere muis of uit een mens te implanteren in een muis, meestal subcutaan, maar in bepaalde gevallen ook orthotoop. In bijlage 2, bij de genetische gemodificeerde modellen (spontaan of induceerbaar) is de aanleg voor het ontwikkelen van kanker al in het genoom aanwezig en ontwikkelt de tumor zich spontaan of kan de ontwikkeling van de tumor op gang worden gebracht door het toedienen van een stof die de genetische modificatie "aan zet". De aanvankelijk inschatting van de aanvrager was dat het onderzoek zich zou ontwikkelen in een richting waarbij steeds meer onderzoeksvragen zouden moeten worden beantwoord met genetische gemodificeerde muismodellen. Nu dit toch niet het geval blijkt te zijn, wil de aanvrager het zwaartepunt verleggen van bijlage 2 naar bijlage 1, overigens zonder dat dit gevolgen heeft voor het totale aantal te gebruiken dieren: 10.000 dieren minder voor bijlage 2 en 10.000 meer voor bijlage 1. In de optiek van de commissie moet de wijzigingsaanvraag zo opgevat worden dat de aanvrager afziet van het gebruiken van een deel van de dieren voor type dierproef 2 en extra dieren wil gebruiken voor type dierproef 1, maar dat deze wijzigingen niet noodzakelijkerwijs met elkaar verbonden zijn. Aangezien dieren die overblijven bij het ene type dierproef niet zomaar gebruikt mogen worden voor een andere type dierproef, met mogelijk andere consequenties voor de dieren, vraagt de aanvrager terecht een aanvulling op de vergunning.

2. Voor zover de DEC weet is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het ontwikkelen, karakteriseren en bestuderen van de muis- en ratmodellen voor kanker. Het ontstaan en verloop van het kankerproces in deze muis- en ratmodellen wordt bestudeerd. Dit kan er onder andere toe leiden dat er kwetsbare punten van de tumor gevonden worden waarop preventief of therapeutisch kan worden ingegrepen. Uiteindelijk kan dit bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe en verbeterde preventieve en therapeutische interventies bij kanker. Dat laatste maakt echter geen deel uit van dit project. Het verband tussen het directe doel en het uiteindelijke doel is weliswaar niet direct, het betreft in de eerste plaats fundamenteel onderzoek, maar wel reëel. Het doel van deze projectaanvraag is gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld, omdat er binnen dat veld consensus is over de waarde van deze aanpak. *De gevraagde wijziging leidt niet tot een aanpassing van (sub)doelstellingen.*
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en het betreffende onderzoeksveld en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress en pijn ondervinden. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat ze belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten kunnen publiceren, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Naar de mening van de DEC dient dat echter geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis). Dit onderzoek is in de eerste plaats fundamenteel van aard en levert informatie en kennis op die van belang is voor de voortgang van het onderzoek in dit veld.
Voor kankerpatiënten is dit onderzoek van belang, omdat het op termijn kan bijdragen aan een verbetering van de mogelijkheden om kanker te behandelen en wellicht ook te voorkomen. Inzicht in het ontstaan en verloop van het kankerproces kan bijdragen aan een gerichte behandeling en diagnostiek met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over een breed palet van mogelijke therapieën voor kanker, een ernstige aandoening die zich in een groot aantal vormen manifesteert, is ook van groot belang voor de samenleving. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*
6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten, omdat handelingen zoals virale transductie en injecties altijd worden verricht in de voorgeschreven, speciaal daarvoor ontworpen ruimtes en laboratoriumkasten. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn

voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit een aantal publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven. De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.

8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Welzijn dieren

9. Er is **geen** sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*
10. De huisvesting en verzorging van de dieren vinden plaats conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt deels bepaald door de handelingen die nodig zijn om de tumoren te induceren en daarna het kankerproces in vivo te volgen (inclusief het beïnvloeden van dat proces om er meer over te weten te komen) en deels door de eigenschappen van de tumoren die worden geïnduceerd of spontaan ontstaan als gevolg van een genetische modificatie. De handelingen voor inductie en monitoring van de tumorontwikkeling (zoals herhaald imageren onder anesthesie met behulp van chirurgisch aangebrachte vensters) leiden tot maximaal matig ongerief. Subcutane tumorgroei van tumoren die niet metastaseren veroorzaken doorgaans niet meer dan licht ongerief. Orthotope tumoren daarentegen, vooral wanneer ze (in)groeien in interne organen, kunnen matig of ernstig ongerief veroorzaken.
Het cumulatief ongerief voor de dieren is naar het oordeel van de DEC juist ingeschat als licht voor 59% van de dieren, matig voor 27% van de dieren en ernstig voor 14%. *De aanvrager meldt, als onderdeel van de ingediende wijzigingsaanvraag, dat in de afgelopen jaren gebleken is dat het ongerief voor beide typen muismodellen in de praktijk lager is geweest dan aanvankelijk werd ingeschat. De classificatie van het ongerief voor de dieren in bijlage 1 en 2 is sterk vergelijkbaar. Het aantal dieren dat ernstig ongerief ondervindt is gedaald van 14% naar 4,5%.*
12. Elke dierproef brengt instrumenteel gebruik van speciaal voor dat doel in gevangenschap gefokte dieren met zich mee, hetgeen op zich al opgevat kan worden als een aantasting van hun integriteit. Omdat dit voor elk project geldt, vermeldt de DEC hier alleen zaken die kenmerkend zijn voor dit specifieke project. De integriteit van de dieren wordt of is aangetast op het niveau van het genoom door (somatische) genetische modificaties die (kunnen) leiden tot de ontwikkeling van kanker. Ook worden door middel van transplantatie tumoren aangebracht die de dieren hinderen in hun normale gedrag, hun zelfredzaamheid en vitaliteit kunnen aantasten en in bepaalde gevallen ook het uiterlijk van het dier zichtbaar veranderen. Het aanbrengen van vensters voor longitudinale imaging heeft een vergelijkbaar effect. De commissie is daarom van mening dat er in een deel van de muizen sprake kan zijn van een vrij aanzienlijke aantasting van de integriteit. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*
13. Voor een relatief groot deel van de dieren waarbij een tumor ontstaat of wordt aangebracht, geldt dat verwacht mag worden dat de dieren een humaan eindpunt bereiken dat overeenkomt

met de criteria van de Code of Practice voor het Kankeronderzoek. Daarbij dient wel te worden opgemerkt dat onderzoek gericht op het ontwikkelen en karakteriseren van muismodellen voor kanker juist vaak tot doel heeft om het verloop van het kankerproces te bestuderen en dat de criteria van de Code of Practice mede de functie hebben om vast te leggen tot welk punt het ethisch aanvaardbaar is om het verloop van dat proces in een levend proefdier te bestuderen. In veel gevallen is bij het inzetten van de proef al duidelijk dat het dier deze criteria zal halen. In lang niet alle gevallen hoeft echter sprake te zijn van ernstig ongerief als het dier op grond van deze criteria uit de proef wordt gehaald. Een subcutane groeiende tumor van (meer dan) 2cm³ vormt een humaan eindpunt volgens de Code of Practice, maar veroorzaakt vrijwel nooit ernstig ongerief. Dit verklaart ook waarom tot wel 50% van de dieren een humaan eindpunt kan halen, terwijl voor maximaal 14% van de dieren ernstig ongerief verwacht wordt.

De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op de experimenten. De commissie is het eens met de inschattingen en met de gehanteerde humane eindpunten. *De verwachting is voor zowel bijlage 1, als bijlage 2 dat tot 50% van de dieren een humaan eindpunt kan bereiken dat overeenkomt met de criteria van de Code of Practice voor het Kankeronderzoek. De gevraagde wijziging heeft derhalve naar verwachting geen invloed op het aantal dieren dat een humaan eindpunt bereikt.*

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Tumor-intrinsieke parameters, die niet per se beïnvloed worden door eigenschappen van het organisme worden in celkweeksystemen bestudeerd. Bij tumorgroei zijn niet alleen tumor-intrinsieke beschadigingen in het erfelijk materiaal van een cel belangrijk, maar ook interacties met de omgeving waarin cellen zich vermeerderen. Een getrouwe nabootsing van kanker bij de mens vereist een diermodel waarin eigenschappen van het organisme (het immuunsysteem, de bloedvoorziening, het metabolisme en de micro-omgeving) het gedrag van tumorcellen beïnvloeden. Het is niet mogelijk om de vraagstellingen van dit project volledig zonder proefdieren te beantwoorden. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijk aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De dieren worden zo kort mogelijk in het experiment gehouden en er worden adequate humane eindpunten gehanteerd. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*
17. Het project betreft geen wettelijk vereist onderzoek. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project in de regel gebruik maken van zowel mannelijke, als vrouwelijke dieren, tenzij het onderzoek betreft naar genen die een rol spelen bij tumoren die geslachtsgebonden zijn. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels en organen na afloop te kunnen uitnemen voor verder onderzoek. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. *De ongeriefpercentages zijn aangepast. Het totale ongerief voor de muizen in de eerste twee bijlagen vermindert (dit betreft een melding, omdat door een bijstelling van het ongerief naar beneden de ethische afweging niet verandert). Voor het overige is er naar het oordeel van de DEC ook geen reden de NTS aan te passen.*

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan? *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*
2. Voor de meeste dieren vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit plaats (beschreven in C9 tot C20). 4,5% van de dieren ondervindt ernstig ongerief. De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
Doel van het project is het ontwikkelen, karakteriseren en bestuderen van muismodellen voor kanker. Dit kan onder andere leiden tot het vinden van "kwetsbare punten" van de tumor waarop mogelijk therapeutisch of preventief kan worden ingegrepen. Uiteindelijk kan dit bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe en verbeterde preventieve en therapeutische interventies bij kanker. Er is dringend behoefte aan nieuwe preventieve en therapeutische benaderingen voor kanker die in combinatie met andere therapieën kunnen worden ingezet om zo de kansen op genezing, of het onder controle houden van de ziekte, te vergroten. Op termijn is het onderzoek daarmee ook voor patiënten en voor de samenleving van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van de gezondheid en kwaliteit van leven van veel mensen. De DEC acht het doel van het onderzoek om deze redenen van groot belang.
3. De DEC is overtuigd van het grote belang van de doelstelling van dit project. De commissie is daarnaast overtuigd van de kwaliteit van het onderzoek van de aanvrager. Dit onderzoek is ingebed in een gerenommeerd instituut dat over alle noodzakelijke voorzieningen beschikt. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste grote belang van de doelstelling de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van het onderzoek op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan. *De gevraagde wijziging heeft geen wezenlijke invloed op deze afweging.*

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste (art. 10a1, lid 3) dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.

Met vriendelijke groet,

10.2 .e. en g



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van
Leeuwenhoek Ziekenhuis
prof. dr. R. Medema
Postbus 90203
1066 CX AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD3010020172464-7
Bijlagen
3

Datum 29 december 2020
Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte prof. dr. Medema ,

Op 25 november 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development and characterization of new mouse models of cancer" met aanvraagnummer AVD3010020172464-7. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf de datum van deze brief is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning is afgegeven voor de periode van 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2023.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door

middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie NKI (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 21 december 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat u wegens COVID-19 een termijn van 12 maanden extra aan de vergunning toegekend heeft gekregen.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 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 93118, 2509 AC 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:
29 december 2020
Aanvraagnummer:
AVD3010020172464-7

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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

Datum:
29 december 2020
Aanvraagnummer:
AVD3010020172464-7

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2.e.eng

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- 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 Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek
Ziekenhuis

Adres: Postbus 90203

Postcode en plaats: 1066 CX AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 30100

deze wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2023, voor het project "Development and characterization of new mouse models of cancer" met aanvraagnummer AVD3010020172464-7, na advies van dierexperimentencommissie NKI. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Groupleader. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 25 november 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 3 juli 2017;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Transplantation models: grafting of human and mouse-derived tumor tissue, zoals ontvangen op 25 november 2020;
 - 3.4.4.2 Spontaneous models: cancer susceptibility by germ-line or somatic gene modification, zoals ontvangen op 25 november 2020;
 - 3.4.4.3 Breeding with discomfort of genetically-modified mice, zoals ontvangen op 17 juli 2017;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 3 juli 2017;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 21 december 2020.

Aanvraagnummer: AVD3010020172464-7

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Transplantation models: grafting of human and mouse-derived tumor tissue			
	Muizen (Mus musculus)	18.000 / 28.000	25,0% Ernstig / 5,0% Ernstig / 37,5% Matig / 15,0% Matig / 37,5% Licht / 80,0% Licht
3.4.4.2 Spontaneous models: cancer susceptibility by germ-line or somatic gene modification			
	Muizen (Mus musculus)	33.200 / 23.200	14,0% Ernstig / 5,0% Ernstig / 32,0% Matig / 25,0% Matig / 54,0% Licht / 70,0% Licht
3.4.4.3 Breeding with discomfort of genetically-modified mice			
	Muizen (Mus musculus)	15.000	100,0% Matig

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Aanvraagnummer: AVD3010020172464-7

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IVD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid 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:
AVD3010020172464-7

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

Aanvraagnummer:

AVD3010020172464-7

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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, eerste lid onder d en derde lid 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.



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for 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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2 .e. eng

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2 .e. eng

1.3 Provide the title of the project.

Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals.

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal
- 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.

Introduction:

The development of new medicines for treatment of human diseases, either chemical entities or biological entities (further to be referred as Test Substances) requires a long research period of many years. The development process is divided into different steps and includes computational chemistry, compound binding studies, functional biological screens, in vitro assays and ex-vivo assays using cell or tissue cultures. The final research phase before entering preclinical development will include efficacy of the new Test Substance in a suitable disease model and assessment of the first indication for adverse effects. However, in early development and without using in-vivo research, the bioavailability of such test substances is nearly impossible to determine. It is therefore important to determine the Pharmacokinetics (PK) of the Test Substance in relation to the proposed treatment route and mode of action in-vivo. In this early stage, the developing company has developed a (small) portfolio of Test Substance candidates sometimes with small structural variations of the Test Substance. These might be small differences in chemical structure or small changes causing differences in affinity in the case of antibodies.

It is then that the first in-vivo screening studies are warranted to make a selection of the Test Substance with the most promising PK profile for further research like efficacy and early toxicology assessments. In these PK studies, the bioavailability, preferred route of administration, half-life of the Test-Substance and first indications of tolerability and/or adverse effects are investigated. For this research, the participation of specialized and experienced companies, so called **10.2.e.eng** is often asked. The information derived from these experiments are used to select the preferred candidate, administration route and dose precluding unsuitable candidates from further development. This in turn will reduce the number of animals to be used in future preclinical studies.

The in vivo studies requested in this project application are limited to Drug Metabolism Pharmacokinetic (DMPK) studies. This project proposal describes the first in-vivo screenings with limited numbers of animals (2 - 24 animals per group) for customers aiming to establish the first in-vivo profile.

Background:

10.2.e.eng

10.2.e.eng scientists have a broad experience in different aspects of the pharmaceutical and chemical development processes and are therefore able to provide clients with expert advice on the studies required including the design and execution of such studies, and the interpretation of the results. They are also able to provide expert advice at key decision points of drug discovery and development, and of chemical registration processes.

3.2 Purpose

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

- If the project is focused 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?

The objective of this project is to (de-)select preclinical candidates based on their PK profile in rat, mouse or guinea pig and/or dog. This will enable and support drug design programs for the development of test substances (pharmacological and biological entities) to be used for treatment of human diseases. The program of work defined under this project proposal will take place early in the discovery stage (i.e. pre-clinical candidate selection and improvement).

The aim of these first in-vivo studies is to establish bio-availability of test substances via determination of pharmacokinetic parameters (C_{max} and AUC in plasma/blood and/or tissues and/or excreta) and based on this (de-)select compounds for further development and/or to select the most optimal route, dose level or formulation.

The technical execution of the studies are described in Standard Operating Procedures.

3.3 Relevance

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

The principal benefit of the project is the provision of data to facilitate decisions on selecting the optimal test substance, route and dose of test substances to which humans will eventually be exposed as part of a treatment for a specific disease. The information derived from these studies will also be used to preclude unsuitable candidates from further development. For these purposes, the use of animals to develop future effective and safe treatments of human diseases is considered socially relevant. In addition, performing

screening studies will reduce the use of animals in the later-stage development process.

3.4 Research strategy

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

General strategy to design the study plan

For each individual PK study, the design and experimental work is documented in a study plan. This is authorized by the Study Director (SD) with respect to the scientific objectives, project compliance and the 3Rs before scientific procedures commence, and is reviewed by the Animal Welfare Body (AWB). All known test substance characteristics and available background information will be taken into account in the design of the study (see 3.4.2) including dose level setting. Dose levels are chosen based on the intended therapeutic dose and pharmacodynamics information available, to preclude any toxicity from occurring. Based on the available information the most appropriate study design will be determined. Studies are designed to obtain a maximum amount of data from the smallest number of animals. In general, the number of animals used for each study is considered to be the minimum needed to meet the aim of the study.

The selection of the animal species will be in principle rodents (rats, mice or guinea pigs only) and or dogs determined (inter alia) by:

- Intended use of the substance;
- Potential pharmacodynamic characteristics of the substance;
- In vitro metabolism data of the substance;
- Potential side effects.

The PK studies tend to be tested in the pharmacodynamics species of choice, so dose predictions for efficacy can be made. Efficacy animal models are usually rat, mice or guinea pig models, depending on the specific target receptor or enzyme of interest. Thus the use of a specific efficacy model will be a driver for the choice of rodent. For instance, the guinea pig will be used as a cough model, and that cannot be in rats or mice, as they are unable to cough (a guinea pig is the smallest mammal that can cough). Therefore, PK studies with medicines intended to treat cough will be performed in guinea pigs. Secondly, cell biology or biochemical assays with human and rodent cell lines will give an indication which rodent cell/protein behaves like the human. In some cases there is more sequence homology of the human receptor/enzymes to one species over the other.

Dogs can be chosen in case there is a disconnect between in-vitro metabolism between human and rodents, or where there is specific intended use (e.g. compounds that are specifically developed to increase the oral bioavailability over the GI tract), or potential side effects (e.g. cardiovascular).

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.

Prior to the start of the in vivo study the following items will be evaluated:

- 1) **Substance identity:** a unique identifier (10.2.e.eng) for the chemical or biological identity of the test substance is determined at this stage.
- 2) **Intended use of the substance and stage of drug development phase:** use in humans for treatment of diseases and studies needed in discovery/screening phase.
- 3) **Most relevant route of exposure:** is generally also used in animal testing. If justified, another less relevant route of exposure may be chosen, e.g. based on technical feasibility / practicality of the testing. In such case, it will be ensured that the study remains valid for its intended use. Sometimes multiple routes of exposure are relevant.
- 4) **Availability of other information:** additional information like physico-, chemical and/or biological information may be collected, like IC50 data from cell assays. This may be used to help drafting an optimal study design and may preclude duplication of studies.
- 5) **Laboratory animal species/strain:** In principle rodents (rats, mice or guinea pigs) are to be selected. Only in case of specific study requirements the use of dogs is warranted (e.g. compound metabolism, physiology of organs, potential side effects).

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.

Process and content of a study

In general, each in-vivo study consist of different phases (details per type of study are included in the Appendices):

- Acclimation phase: animals will be habituated to their environment, diet etc., which

- promotes both animal welfare and reproducible experimental results.
- *Test phase:* Test substances and, if needed, positive and/or negative (vehicle) control substances are administered by scientifically relevant routes, followed by clinical observations, and collection of blood and optional other body fluids, excreta and/or organs/tissues for subsequent analysis.
- *Recovery phase:* In case of dogs, a recovery phase of at least two weeks will be used in between different studies. Dogs will only be re-used in case the discomfort has not exceeded moderate.

Usually a single dose will be administered using varying routes and/or doses. Only in specific cases (where compound accumulation is a potential concern), repeated dosing for maximally one week may be necessary to reach maximal plasma levels. The route and frequency of administration will be detailed in the study plan. Treatment in fasted or fed animals is possible, depending on substance characteristics. Guinea pigs are more sensitive for diet restrictions and will not be fasted. All treatment specifications and justifications will be documented in the study plan and is subject to review of the Animal Welfare Body according to Wod art 10.1.3.

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	Pharmacokinetic screening in rodents
2	Pharmacokinetic screening in dogs

This project consists of 2 appendices as summarized below. A more detailed description is given in Appendices 1 and 2. In most cases rodents are the preferred species for first PK studies, but depending on the intended use of the compound, pharmacodynamics characteristics or metabolism of the compound, dogs might be needed instead of rodents. Occasionally, PK studies in rodents might be followed by PK studies in dogs for a selection of test substances.

- Appendix 1: Pharmacokinetic screening in rodents
- Appendix 2: Pharmacokinetic screening in dogs

Appendix 1 –Pharmacokinetic testing in rodents: Basic kinetic parameters determined in these studies will provide information on the availability of the Test Substance in blood / organs, half-life and potential for accumulation of the test substance in tissues and/or organs and the potential of biotransformation following exposure to the test substance. Kinetics will help to determine the optimal route and dose for further evaluation of the test substance and potential (unwanted) side effects. This will help the client in selecting the most promising candidate (whether or not a candidate should be developed further), selection of formulations, treatment regimens, dose levels and/or routes of administration.

Appendix 2 – Pharmacokinetic testing in dogs: Similar type and goal of studies as Appendix 1. Studies will be executed in dogs; depending on the intended use of the compound, pharmacodynamics characteristics, metabolism of the compound, or potential side effects, dogs can be the appropriate species to screen compounds for PK characteristics. This rationale for the use of dogs needs to be well-defined and documented.

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 10.2 .e. en g
2. Titel van het project : Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals
3. Titel van de NTS : Farmacokinetische screening van potentiële geneesmiddelen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer : [redacted]

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : 10.2 .e. en g
Naam contactpersoon : [redacted]
Emailadres contactpersoon : [redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 7-8-2019
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 8-8-2019
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 14-8-2019 tot 3-10-2019
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag: 3-10-2019
 advies aan CCD: 10-10-2019

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager: nvt

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 14-8-2019
- Datum antwoord: 3-10-19
- Gestelde vragen en antwoorden:

De projectvergunning loopt nog 10.2 .e. en g), maar in bijlage 1 wordt het benodigde aantal voor de komende [redacted] jaar gegeven. Kunt u het benodigde totale aantal dieren onderbouwen (of aanpassen)?

Het dieraantal was inderdaad gebaseerd op [redacted] jaar, excuus, we hadden ons niet gerealiseerd dat de looptijd nog maar [redacted] jaar was. Het dieraantal is nu aangepast naar 500 dieren, zowel in Appendix 1 als in de NTS.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project..

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.
Zie het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (bijlage 1)
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden (in rood de tekst uit het oorspronkelijke advies behorend bij deze projectaanvraag).

4. Het directe doel is het bepalen van farmacokinetische eigenschappen, die een eerste indicatie geven van de biologische beschikbaarheid van stoffen. In een screening-opzet worden eigenschappen van meerdere stoffen met elkaar vergeleken met als doel stoffen te selecteren of te deselecteren voor verdere ontwikkeling tot geneesmiddel. De algemeen geaccepteerde gedachtegang hierbij is dat de biologische beschikbaarheid in proefdieren voorspellend is voor de biologische beschikbaarheid in de mens.

Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het doel van het amendement is beschreven en goed onderbouwd. In de huidige aanvraag was de cavia als soort voor pK-studies niet opgenomen. De pK-studies voor deze dieren zijn echter wel nodig omdat cavia's kunnen hoesten, en de benodigde dosering(en) moet(en) worden vastgesteld voor het 'caviahoestmodel', dus in het dier dat ook later dat onderzoek zal ondergaan. Dit is uitvoerig toegelicht door de IvD tijdens de vergadering. Muizen en ratten zijn ongeschikt als model voor hoesten.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld).

De samenleving heeft belang bij beschikbaarheid van betere geneesmiddelen. Hier wordt een gezondheidsbelang gediend. Van ontwikkelaars van geneesmiddelen/aanbieders van stoffen wordt een aanmerkelijk economisch belang gediend. Door vroege (de)selectie van stoffen wordt het gebruik van proefdieren voor verder onderzoek beperkt, waarmee belangen van proefdieren en samenleving worden gediend. Van de indiener wordt een aanmerkelijk economisch belang gediend.

Van de proefdieren worden integriteit- en welzijn waarden aangetast.

Voor het amendement zijn de belanghebbenden en de morele waarden ongewijzigd.

6. De DEC ziet geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken

Proefopzet en haalbaarheid

7. De aanvrager heeft een lange traditie in het uitvoeren van de beschreven DMPK-studies van stoffen en screeningstudies. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager in de loop der jaren voor het uitvoeren van deze projectaanvraag alle relevante deskundigheid en vaardigheid heeft opgebouwd. De ervaring van de onderzoeksgroep met meer complexe kinetiek studies staat niet alleen borg voor een goede uitvoering maar ook voor een goede aansluiting bij (al dan niet) wettelijk verplicht vervolgonderzoek door de geneesmiddel ontwikkelaar.

Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

8. De aanvraag betreft het verkrijgen van farmacokinetische (DMPK) gegevens van reeksen van twee of meer nieuwe stoffen waarvan geen in vivo data bekend zijn (first in animal studies). Deze stoffen zijn kandidaat geneesmiddelen en de verzamelde DMPK gegevens zijn van belang voor selectie/deselectie van stoffen voor verdere ontwikkeling als geneesmiddel voor de mens door farma bedrijven. Het gaat hierbij dus om een stap in het vroege ontwikkelingstraject van geneesmiddelen.

De indiener van de projectaanvraag is niet de geneesmiddelontwikkelaar maar voert de beschreven screeningstudies uit voor anderen. De aanvraag betreft een 10.2 e. en g project waarin de exacte aard van de te testen stoffen nog niet bekend is. Hoewel de beschreven screeningstudies volgens dezelfde hoofdlijnen verlopen, wordt elke test toegesneden op de specifieke stof en vraag. Hiervoor is onder research strategy een procedure beschreven waarin samen met de opdracht gevende partij noodzakelijke stofgegevens en beoogde indicatie worden betrokken bij het ontwerpen van de optimale dierproef die wordt vastgelegd in een werkprotocol. Dit werkprotocol wordt voorafgaand aan de uitvoering, getoetst door de IvD. De DEC acht deze procedure deugdelijk. In de aanvraag worden proefopzet en primaire uitkomstparameters helder beschreven en deze sluiten naadloos aan bij de doelstelling van het project. De DEC is overtuigd van de goede uitvoerbaarheid van het project. De aanvraag betreft het verkrijgen van farmacokinetische (DMPK) gegevens van reeksen van twee of meer nieuwe stoffen waarvan geen in vivo data bekend zijn (first in animal studies). Deze stoffen zijn kandidaat geneesmiddelen en de verzamelde DMPK gegevens zijn van belang voor selectie/deselectie van stoffen voor verdere ontwikkeling als geneesmiddel voor de mens door farma bedrijven. Het gaat hierbij dus om een stap in het vroege ontwikkelingstraject van geneesmiddelen. De indiener van de projectaanvraag is niet de geneesmiddelontwikkelaar maar voert de beschreven screeningstudies uit voor anderen. De aanvraag betreft een 10.2 e. en g project waarin de exacte aard van de te testen stoffen nog niet bekend is. Hoewel de beschreven screeningstudies volgens dezelfde hoofdlijnen verlopen, wordt elke test toegesneden op de specifieke stof en vraag. Hiervoor is onder research strategy een procedure beschreven waarin samen met de opdracht gevende partij noodzakelijke stofgegevens en beoogde indicatie worden betrokken bij het ontwerpen van de optimale dierproef die wordt vastgelegd in een werkprotocol. Dit werkprotocol wordt voorafgaand aan de uitvoering, getoetst door de IvD. De DEC acht deze procedure deugdelijk. In de aanvraag worden proefopzet en primaire uitkomstparameters helder beschreven en deze sluiten naadloos aan bij de doelstelling van het project. De DEC is overtuigd van de goede uitvoerbaarheid van het project.

Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. *Dit is ook het geval voor de in deze wijziging toegevoegde dieren (cavia's).*

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.
De dieren worden gehuisvest volgens de richtlijn.
Slechts in bijzondere gevallen wordt hiervan afgeweken (bijv. solitaire huisvesting ter voorkoming van bijtincidenten of na instrumentatie, verblijf in metabole kooi in geval excreta moeten worden verzameld). Afwijkingen worden afdoende beargumenteerd in de aanvraag en zullen nader worden onderbouwd in het werkprotocol en afgestemd met de IvD.
Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
De handelingen die verricht worden aan de dieren bestaan in de meeste gevallen uit het toedienen van een stof via een of meer bekende toedieningsroutes en vervolgens het afnemen van een aantal bloedmonsters ter bepaling van de (resterende) concentratie van die stof in de circulatie. Dit wordt ingeschat als mild ongerief (in overeenstemming met Richtlijn 2010/63/EU bijlage VIII). De huisvestingscondities zijn daarbij soms afwijkend van normaal (zie vraag 10) wanneer urine en feces opgevangen moeten worden, of wanneer dieren om andere redenen tijdelijk alleen gehuisvest moeten worden (agressie, instrumentatie). Er wordt ook rekening gehouden met de situatie dat een bloedvat gecanuleerd moet worden of dat kortdurend voedseldeprivatie vereist is om de benodigde DMPK gegevens te verkrijgen. In die gevallen – van extra handelingen bovenop de stoftoediening en bloedafnames - zal het cumulatieve ongerief veelal op matig uitkomen. Dat is voorzien voor 20% van de dieren in appendix 1 & 2. Dit percentage is gebaseerd op ervaring van de afgelopen jaren. De DEC vindt dit een navolgbare schattingsgrond.
Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

12. De fysieke integriteit wordt aangetast door toediening van teststof, bloedafname, in sommige gevallen ook door chirurgische interventie (canulatie) of tijdelijke voedseldeprivatie. Gedragmatig integriteit wordt aangetast in geval van afwijkende huisvesting of instrumentatie.
Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).
Er wordt verwezen naar het OECD guidance document on humane endpoints (ENV/JM/MONO/ 2000/7). Deze is echter bedoeld voor 'EXPERIMENTAL ANIMALS USED IN SAFETY EVALUATION'. De DEC vraagt

zich af of deze verwijzing terecht is. Het betreft immers geen TOX studies maar DMPK studies. Zij adviseert daarom specifieke humane eindpunten te beschrijven die gerelateerd zijn aan dit soort DMPK studies. De kans dat dieren een humaan eindpunt bereiken wordt ingeschat als <1%. De DEC acht dit realistisch omdat het standaard-technieken betreft waarmee de aanvrager veel ervaring heeft. *Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.*

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, immers zoals ook bij 4 is aangegeven kunnen muizen en ratten niet hoesten en cavia's wel. Om een effectieve dosis te kunnen bepalen via een pK-studie is het dan logisch (en goed toegelicht door de IvD) dat dan de pK studies ook in de cavia worden uitgevoerd.
15. Het aantal te gebruiken dieren voor deze wijziging is, na de door de DEC gestelde vraag over het aantal cavia's ten opzichte van de looptijd, realistisch ingeschat voor de komende drie jaar, de periode is dat het project nog is vergund. *Zie ook het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag. Er is onderbouwd waarom bij cavia's de groepsgrootte iets groter is, omdat daar minder bloedmonsters genomen kunnen worden.*
16. Het project wordt uitgevoerd in overeenstemming met de vereisten van verfijning. De experimenten worden zo eenvoudig mogelijk opgezet, met zo weinig mogelijk ongerief voor de dieren. Alleen in speciale gevallen zullen aanvullende methoden zoals canulatie, voedseldeprivatie en huisvesting in metabole kooien worden toegepast. De noodzaak hiervoor zal nader worden onderbouwd in het werkprotocol en afgestemd met de IvD. Stoffen worden in zo laag mogelijk dosering gegeven. Zo wordt de kans op (ongewenste) effecten geminimaliseerd. Verder wordt opgemerkt dat de aanvrager betrokken is bij het 'Dutch 3R center' en belang hecht aan de implementatie van best practice ontwikkelingen. *Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft aanleiding deze vraag iets anders te beantwoorden: de cavia's zullen geen voedseldeprivatie ondergaan omdat ze daar gevoeliger voor zijn.*
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Een screeningsstudie wordt uitgevoerd met dieren van één geslacht. Voor de meeste studies is de geslachtskeuze arbitrair. De DEC gaat er daarom van uit dat de geslachtskeuze bepaald zal worden door praktische overwegingen waaronder de beschikbaarheid van dieren en daarmee een bijdrage zal kunnen leveren aan beperking van dieren in voorraad gedood. *Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag (zie bijlage 1). Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.*
19. Dieren worden gedood in het kader van de proef vanwege het verkrijgen van bloed/weefsels voor bepaling van concentraties teststof en/of metabolieten. Dodingsmethoden zijn in overeenstemming met bijlage IV van de richtlijn. Wanneer geen stofconcentraties in weefsels bepaald moeten worden, zullen

honden niet gedood worden maar kunnen worden hergebruikt.

Zie hierboven het advies behorend bij de oorspronkelijke aanvraag. Het amendement geeft geen aanleiding deze vraag anders te beantwoorden.

20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. *De wijziging is in de NTS opgenomen.*

D. Ethische afweging

1. Weegt het belang van het verkrijgen van biodistributie gegevens ten behoeve van selectie of deselectie van potentiële farmaca voor de mens op tegen de aantasting van de integriteit en welzijn van de proefdieren, *inclusief de 500 cavia's beschreven in de wijziging?*
2. Voor de ontwikkelaar van geneesmiddelen is het van groot belang om dierproeven te doen die voorspellend zijn voor de werking en risico's van nieuwe geneesmiddelen in de mens. De aangevraagde screeningstudie is daar een voorbeeld van. Door deze dierproeven wordt de blootstelling van mensen aan onwerkzame of risicovolle stoffen beperkt, hetgeen door de DEC gezien wordt als een aanmerkelijk maatschappelijk belang, evenals de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Tegenover deze maatschappelijke belangen staat dat het doen van dierproeven op zich door een deel van de samenleving als moreel problematisch wordt gezien. De aanvrager (toez en s) heeft een aanmerkelijk economisch belang bij uitvoering van de beschreven dierproeven. Van de proefdieren worden zowel de fysieke als gedragsmatige integriteit aangetast en wordt het welzijn (stress, pijn, ongemak) geschaad, zij het in geringe (80%) of matige (20%) mate. Beschikbaar komen van nieuwe geneesmiddelen ter preventie of behandeling van ziekten bij mensen is van groot belang. De geneesmiddelontwikkelaar produceert daartoe middels proefdiervrije technieken (chemie, in silico, celbiologie, genetics, etc) veelal reeksen van stoffen waaruit een selectie moet worden gemaakt voor verdere ontwikkeling. Selectie is een cruciale stap in het proces van ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Screening en selectie op DMPK eigenschappen is daarbij hoogst relevant. De geneesmiddelontwikkelaar besteedt die screening vaak uit aan een gespecialiseerde (toez en s) zoals de aanvrager van dit project. Zonder screening en selectie staakt het ontwikkelingsproces. Tegenover deze maatschappelijke en economische belangen van verschillende partijen die gediend worden, staat de geringe tot matige aantasting van welzijns en integriteits belangen van de betrokken dieren.

In aanvulling op bovenstaande afweging uit het advies bij het oorspronkelijke project het volgende. De in de wijziging beschreven dieren (cavia's) zullen specifiek worden gebruikt om pK-studies uit te voeren met middelen tegen hoesten. In dat opzicht verschilt het doel niet van het oorspronkelijke doel. Ook zijn de handelingen niet anders dan voor de beschreven dieren en is het ongerief gelijk aan dat bij de muis en de rat. De aanvrager heeft aannemelijk gemaakt dat voor specifieke vragen de muis of de rat ongeschikt is en dat de cavia een beter modeldier is voor deze specifieke klasse stoffen, die later in een hoestmodel eveneens in de cavia verder zullen worden onderzocht op werkzaamheid. De gevraagde aantallen zijn naar aanleiding van de vraag van de DEC herberekend en bijgesteld naar een verwacht gebruik voor drie jaar. Met dit amendement wordt het aantal dieren met 500 verhoogd, waarvan maximaal 20% matig

ongerief zal ondergaan. Dit doet het gewicht van de afweging iets verschuiven, maar niet zodanig dat de balans naar de andere kant doorslaat. Het maatschappelijke belang blijft zeer zwaarwegend.

3. Overwegende

1. het aanmerkelijke belang van dit screeningsonderzoek naar potentiële geneesmiddelen
 2. de goede kennis en kunde en jarenlange ervaring met dit onderzoek van de onderzoeker
 3. de goede uitvoerbaarheid en haalbaarheid van het project
 4. de afwezigheid van proefdiervrije alternatieven
 5. de toezegging van de onderzoeker om dieren aantallen tot een minimum te beperken
 6. het belang dat de onderzoeker aan verfijning hecht
 7. dat humane eindpunten weliswaar nader beschreven kunnen worden, maar dat deze slechts zelden gehaald zullen worden
 8. dat honden alleen worden gebruikt als de doelstelling niet met ratten of muizen kan worden gehaald
- komt de DEC unaniem tot de conclusie dat het belang van het verkrijgen van biodistributie gegevens ten behoeve van selectie of deselectie van potentiële farmaca voor de mens opweegt tegen de aantasting van de integriteit en het welzijn van de proefdieren.

Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat ook het in deze wijziging beschreven gebruik van de cavia's voor pK-studies, met het doel de juiste dosering(en) vast te stellen voor het hoestmodel, een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren, inclusief de 500 toegevoegde cavia's. Het gebruik van de extra proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.
- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

10.2 .e. en g

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

10.2 .e. en g

Uw referentie

uw ref

Bijlagen

1

Datum 22 oktober 2019

Betreft Beslissing Aanvraag wijziging projectvergunning dierproeven

Geachte heer 10.2 .e. en g

Op 24 juli 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals" met aanvraagnummer 10.2 .e. en g, waarvoor op 10.2 .e. en g een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer 10.2 .e. en g. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u 500 cavia's toe te voegen aan de vergunning. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Pharmacokinetic screening of pharmaceuticals" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie de Nieuwe DEC (hierna: de DEC). Dit advies is opgesteld op 11 oktober 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Wij nemen dit advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Overwegingen

Op grond van de bovenstaande stukken zijn wij van mening dat de toe voegen dierproeven toelaatbare wijzigingen betreffen van het project, waarvoor op 10.2 .e. en g een vergunning is verleend.

Vergunning

Aan uw vergunning worden de volgende dierproeven toegevoegd:

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1: Pharmacokinetie screening in rodents	Cavia's (Cavia porcellus)	500	20% Matig 80% Licht

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.
U dient deze brief toe te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

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 93118, 2509 AC, 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 gegevens in het colofon.

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.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Drs. F. Braunstahl

Bijlagen
- DEC-advies

Datum
22 oktober 2019

Onze referentie
Aanvraagnummer

10.2.e.eng

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).
- 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.	Vitaal en Gezond Kalf

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic Research
 - Translational or applied research
 - Regulatory use of routine production
 - Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare di(er)
 - 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.

Nieuwe kennis nodig voor verbeteren vitaliteit en gezondheid van (jonge) vleeskalveren

AANLEIDING

Kalveren die op melkveebedrijven worden geboren hebben voor het overgrote deel de volgende twee bestemmingen: (i) het merendeel van de vrouwelijke kalveren is voorbestemd als melkkoe, en wordt als zogenaamd fokkalf opgefokt op het melkveebedrijf van geboorte, na de puberteit geïnsemineerd, en na afkalven opgenomen in de koppel melkgevende dieren, (ii) met merendeel van de mannelijke kalveren wordt verkocht en fungeert als het uitgangsmateriaal voor de vleeskalverhouderij. Deze kalveren verlaten het melkveebedrijf op een leeftijd van ongeveer twee weken, worden samengebracht op een verzamelcentrum, ingedeeld in uniforme groepen, en vervolgens als koppel aangevoerd op het vleeskalverbedrijf. Op het vleeskalverbedrijf groeien de dieren op in een periode van 6 tot 8 maanden, waarna ze geslacht worden. Ongeveer de helft van de kalveren die in de Nederlandse vleeskalverhouderij jaarlijks worden aangevoerd is afkomstig uit het buitenland, met name Duitsland. Dit betekent dat transport – en in het geval van een deel van de buitenlandse kalveren langdurig transport – een belangrijke 'challenge' is in het leven van jonge vleeskalveren. Een aanhoudend probleem in de houderij van zowel fok- als vleeskalveren is een hoge incidentie van gezondheidsproblemen bij de dieren. Dit leidt tot een hoge uitval en de noodzaak om veelvuldig medicaties in te zetten, waaronder antibiotica. In het project "Vitaal en gezond kalf in een duurzame veehouderij" wordt ketenbreed onderzoek gedaan naar nieuwe manieren van houderij van vleeskalveren – met het accent op de (vroeg) voeding, transport, en opvang op het vleeskalverbedrijf – waarbij het doel is om de gezondheidsstatus van kalveren te verbeteren, met als bijkomende gevolgen een beter dierenwelzijn, een verlaging van het gebruik van antibiotica, en een duurzamere bedrijfsvoering door minder uitval en betere technische resultaten.

De omstandigheden waaronder vleeskalveren worden gehouden zijn – begrijpelijkerwijs – aanleiding voor maatschappelijk debat, en staan onder de aandacht van (nationale en Europese) regelgevende en controlerende instanties, waaronder in Nederland het Ministerie van Economische Zaken, en de NVWA. Het project "Vitaal en gezond kalf" beoogt ook een bijdrage te leveren aan dit debat, in het bijzonder door in detail inzicht te verschaffen in de effecten van lange-afstandstransport op gezondheid en welzijn van jonge kalveren, zowel op de korte (direct na afloop van het transport) als op de langere termijn (gedurende de mestperiode na aankomst op het vleeskalverbedrijf). Het hier beschreven onderzoek zou bijvoorbeeld kunnen uitwijzen dat (varianten van) lange afstandstransport binnen de kaders van de huidige Europese regelgeving geen evident nadelige gevolgen hebben

voor gezondheid en welzijn van kalveren. Het onderzoek zou daarentegen ook aan kunnen tonen het onderwerpen van jonge kalveren aan lange afstandstransport niet verenigbaar is met het waarborgen van aanvaardbare niveau's van gezondheid en welzijn van de dieren. Dergelijke bevindingen zouden een stimulans kunnen geven aan het bewerkstelligen van systeemveranderingen in de Nederlandse kalverhouderij.

ACHTERGROND

Dit projectvoorstel is erop gericht om gezondheid en welzijn van vleeskalveren door de keten heen te verbeteren. Het accent in dit projectvoorstel ligt op 1) de houderijomstandigheden van toekomstige vleeskalveren op het melkveebedrijf, 2) het transport van jonge kalveren, en 3) de opvang van kalveren op het vleeskalverbedrijf, en de invloed van deze factoren op gezondheid en weerstand van de dieren. Het centrale uitgangspunt in het onderzoek is dat vleeskalveren zoveel mogelijk longitudinaal worden vervolgd, d.w.z. door de keten heen tot en met de slachterij. Daarbij worden uiteindelijk relaties gelegd tussen dierkenmerken en behandelingen gemeten en opgelegd tijdens vroege opfok, transport en opvang enerzijds, en de 'performance' van de dieren in termen van ziekte-incidentie, antibioticumgebruik, uitval en groei op het vleeskalverbedrijf anderzijds. De eerste schakel in de Nederlandse vleeskalverketen is het melkveebedrijf waar de toekomstige vleeskalveren worden geboren, en gedurende de eerste 2-3 weken opgefokt. Deze schakel is bepalend voor de uitgangspositie van het kalf, en voor de mate waarin het dier gevoelig (of gepredisponeerd) is voor latere (gezondheids)problemen. Cruciaal in dit stadium is de de conditie van de koe waaruit het kalf wordt geboren, voeding en de verzorging van het jonge kalf, en de ontwikkeling van het dier op het moment dat het wordt afgevoerd van het melkveebedrijf en aangevoerd op het vleeskalverbedrijf. Kalveren afkomstig van verschillende melkveebedrijven binnen een bepaald gebied worden samengebracht op een zogenaamd verzamelcentrum. Daar worden kalveren ingedeeld in koppels en vervolgens naar het vleeskalverbedrijf getransporteerd. De duur van het transport is afhankelijk van de geografische locatie van het vleeskalverbedrijf van bestemming. Het verblijf op een verzamelcentrum en de blootstelling aan (lange-afstands)transport kunnen beschouwd worden als omgevingsfactoren die een aanpassingsreactie - of adaptatie - zullen vragen van de kalveren. De impact van deze factoren is mede afhankelijk van de manier waarop de kalveren op het verzamelcentrum worden behandeld en verzorgd, en de wijze waarop de dieren worden getransporteerd. De laatste schakel in de vleeskalverketen is het vleeskalverbedrijf. De aankomst van de dieren op het vleeskalverbedrijf is een laatste omgevingsfactor die een aanpassingsreactie van de kalveren vraagt. De manier waarop de dieren worden opgevangen en verzorgd tijdens de eerste dagen/weken na aankomst op het vleeskalverbedrijf bepaalt mede de impact van deze nieuwe omgeving op het aanpassingsvermogen van het jonge kalf. Naast adaptatie op de kortere termijn is, vanaf het moment van aankomst op het vleeskalverbedrijf, ook het herstellend vermogen van de dieren een cruciaal biologisch proces van belang voor het verdere functioneren tot aan het moment van slachten. De invloed van omgevingsfactoren en 'challenges' waaraan jonge vleeskalveren vanaf het moment van geboorte blootstaan zijn uiteindelijk bepalend voor de 'performance' van de dieren op het vleeskalverbedrijf in termen van ziekte-incidentie, antibioticumgebruik, uitval en groei.

In dit project wordt (i) gezocht naar houderijfactoren die gezondheid en welzijn - i.c. 'performance' - van kalveren verbeteren, en (ii) worden gedetailleerde waarnemingen gedaan aan onderliggende biologische processen met betrekking tot adaptatie en herstellend vermogen van kalveren, waarmee een indruk wordt verkregen van de impact die deze factoren hebben op het dier. De houderijfactoren die in dit project bestudeerd worden zijn gekozen op grond van perspectiefrijke aanwijzingen uit de wetenschappelijke literatuur. In dit project wordt een zogenaamde multifactoriële opzet gehanteerd. Dat betekent dat meerdere houderijfactoren in hetzelfde experiment systematisch worden gevarieerd. Dat maakt het mogelijk om ook naar interacties tussen factoren te kijken - zowel binnen als tussen verschillende schakels in de vleeskalverketen. Bijvoorbeeld tussen verschillende manieren van opfok van jonge kalveren op het melkveebedrijf en verschillende opvangregimes van kalveren op het vleeskalverbedrijf, of tussen verschillende manieren van behandeling/voeding van kalveren op het verzamelcentrum en verschillende wijzen of duren van transport. Kennis van dergelijke interacties is essentieel voor de praktijk, en daarvoor zijn goed opgezette volledige factoriële studies een voorwaarde.

1. Voeding van kalveren

Het wordt steeds duidelijker dat de voeding tijdens de (vroeg) opfok van kalveren langdurige effecten kan hebben op hun biologisch functioneren. Uit epidemiologisch onderzoek blijkt bijvoorbeeld dat vaarskalveren die tijdens de opfok relatief veel biest en kalvermelk kregen ten opzichte van dieren op een relatief laag voerniveau later als melkkoe meer melk produceerden. Het werkingsmechanisme achter dit effect is nog niet opgehelderd, maar verondersteld wordt dat sprake is van vroege programmering van belangrijke biologische systemen zoals het metabole en het immuunsysteem (Soberon en Van Amburgh, 2013). Bij stierkalveren is aangetoond dat een hoge melk opname tijdens de opfok niet alleen leidt tot een snellere groei, maar ook positieve effecten heeft op het (innate) immuunsysteem, waardoor kalveren beter bestand waren tegen experimentele infecties (Olivett et al., 2012; Ballou et al., 2015). Uit een recente cross-sectionele studie (Brscic et al., 2012) uitgevoerd op vleeskalverbedrijven uit drie kalfvleesproducerende landen (Nederland, Frankrijk en Italië) kwam naar voren dat koppels, die bij het opzetten op het vleeskalverbedrijf gemiddeld zwaarder waren (> 51 kg) in vergelijking met gemiddeld lichtere koppels (< 43 kg), drie weken na aankomst een significant lagere prevalentie van 'abnormale ademhaling' (indicatief voor luchtwegaandoeningen) lieten zien (ongeveer een factor drie lager). De achtergrond achter dergelijke gewichtsverschillen was in dit onderzoek niet bekend en naast verschillen in groei zouden ook verschillen in leeftijd een rol kunnen spelen; zwaardere kalveren zouden ook oudere dieren kunnen zijn. Jonge kalveren hebben een nog onderontwikkeld immuunsysteem, waardoor ze ten opzichte van oudere dieren bijvoorbeeld minder goed bestand kunnen zijn tegen transportstress (Swanson en Morrow-Tesch, 2001).

Onderzoek bij mensen en laboratoriumdieren, en recent bij varkens en kippen wijst erop dat voedingsmiddelen, -bestanddelen of -strategieën (i) een direct effect kunnen sorteren op de functionaliteit van immuuncellen, en (ii) de microbiota in de darm kunnen beïnvloeden. Beide effecten beïnvloeden de immuun competentie. Voorbeelden van voedingsbestanddelen met een direct effect op het immuunsysteem zijn bepaalde mineralen of vitamines (zoals zink of vitamine D, zie Prasad, 2008; Baeke et al., 2010). Deze kunnen effecten hebben op bijvoorbeeld monocyten, macrofagen, dendritische cellen en T-lymfocyten. De microbiota in de darm heeft naast functionele effecten op de darmmucosa en het onderliggende lokale immuunsysteem, ook effecten op het systemische immuunsysteem en daarmee op de gezondheid en de weerstand tegen ziekten (Clarke et al., 2010; Smits et al., 2014; Brugman et al., 2015; Vandenplas, 2015). Op grond van dit principe kunnen voedingsinterventies die de microbiota van de darm beïnvloeden effectieve strategieën zijn om de immuun competentie en de gezondheid van mensen en (landbouwhuis)dieren te bevorderen (zie Trompette et al., 2014; van Krimpen et al., 2014; Doré en Blottière, 2015). De belangrijkste voedingsstrategieën waarmee de microbiota in de darm kunnen worden beïnvloed zijn: (i) de toediening van probiotica – of levende bacteriën, en (ii) de toediening van prebiotica, d.w.z. voedingsbestanddelen die de groei of de activiteit van de microbiota in de darm kunnen beïnvloeden (zie Chaucheyras-Durand en Durand, 2010; Slavin, 2013; van Krimpen et al., 2014). Bij varkens zijn voedingsstrategieën gebruikt waarbij pro- en/of prebiotica in het rantsoen worden gecombineerd met andere immuun competentie bevorderende voedingsbestanddelen, zoals mineralen en vitamines (zie Heo et al., 2013). Een aantal probiotica (zoals *Lactobacillus*) en prebiotica (zoals oligosacchariden) is inmiddels al op kleine schaal beproefd bij runderen, waarbij onder meer effecten op het immuunsysteem en de groei zijn gevonden (Burdick Sanchez et al., 2013; Agazzi et al., 2014; Uyeno et al., 2015). Hersom et al. (2015) pasten dergelijke alternatieve voedingsstrategieën toe bij pas gespeende kalveren van vleesrassen, in een poging om de dieren voor te bereiden op de latere afmestperiode in een feedlot (het zogenaamde 'preconditioning').

Hypothesen:

- Voeding van vleeskalveren, zowel tijdens de (vroeg) opfok als op latere leeftijd kan een effectieve tool zijn om het weerstandsvermogen te verbeteren, en dieren beter bestand te maken tegen veranderingen ('challenges') die ze doormaken vanaf het moment dat ze het melkveebedrijf verlaten.

- Het op oudere leeftijd aanvoeren van kalveren op het vleeskalverbedrijf – in combinatie met een hoger lichaamsgewicht – zou eveneens een factor kunnen zijn die het aanpassingsvermogen van jonge vleeskalveren positief beïnvloed.

2. Transport en opvang van kalveren

Jonge kalveren zijn gevoelig voor temperatuurswisselingen tijdens transport en hebben met name bij lage temperaturen moeite om hun lichaamstemperatuur op pijl te houden (Schrama et al., 1996; Knowles et al., 1999). Tijdens veetransporten kunnen grote temperatuurswisselingen optreden en recent onderzoek bij vleesvee heeft aangetoond dat, naast factoren gerelateerd aan bijvoorbeeld transportduur en kwaliteit van rijden, het klimaat in de vrachtwagen gerelateerd is aan gezondheids- en welzijnsindicatoren zoals gehalten aan stresshormonen en de mate van gewichtsverlies tijdens transport (González et al., 2012; Goldhawk et al., 2014). Ook na aankomst op het vleeskalverbedrijf is het klimaat, waaronder de temperatuur, een kritische omgevingsfactor voor kalveren. Met name in grote kalverstallen kan het moeilijk zijn om de omgevingstemperatuur voor jonge dieren op pijl te houden en de handhaving van een voldoende hoge temperatuur kan ten koste gaan van de ventilatie. Naast omgevingstemperatuur is de voeding in de periode na aankomst op het vleeskalverbedrijf een belangrijke houderijfactor. De succesvolle aanpassing van kalveren aan lage omgevingstemperaturen is afhankelijk van de beschikbaarheid en opname van voldoende voeding (Nonnecke et al., 2009). Omdat runderen na afloop van een transport vaak een verminderde voeropname laten zien, wordt in de context van bijvoorbeeld de Amerikaanse vleesindustrie vooral aangedrongen op de ontwikkeling van nieuwe voedermiddelen met een hoge energie-inhoud en nutritionele waarde, die gemakkelijk kunnen worden opgenomen door dieren die op een kalverbedrijf arriveren (Duff en Galyean, 2007). In dit verband is ook relevant dat stierkalveren, die een hoog kalvermelk opname hadden, sneller bleken te herstellen van een experimentele infectie met *Cryptosporidium* dan dieren op een laag voerniveau (minder uitdroging, eerder stoppen met diarree) (Ollivett et al., 2012). Daarnaast zijn er aanwijzingen dat de eerder genoemde immuun competentie-verhogende voedingssupplementen, zoals prebiotica, mogelijk ook van belang kunnen zijn bij het herstel van jonge kalveren na transport (Eicher et al., 2010).

Conform de EU-regelgeving worden op dit moment kalveren die maximaal 19 uur onderweg zijn geweest vanuit het buitenland op een zogenaamde Control Post uitgeladen, waar de dieren 24 uur moeten rusten voordat ze weer opnieuw vervoerd kunnen worden. Vragen omtrent de wenselijkheid van het op die manier onderbreken van langeafstandstransport komen voort uit een onderzoek na lange afstandstransport van kalveren minder dan 3 weken oud (Knowles et al., 1997). In dit onderzoek werden kalveren hetzij onderbroken gedurende 24 uur getransporteerd zonder toegang tot voer en water, of elke 8 uur op de vrachtwagen voorzien van electrolyten in water opgelost. Deze behandeling reduceerde de effecten van voedsel- en waterdeprivatie in beperkte mate, maar tegelijkertijd suggereerden deze auteurs dat dit voordeel niet opweegt tegen de verstoring die zou optreden wanneer kalveren worden afgeladen en 24 uur in een verzamelcentrum zouden worden gehouden, met als bijkomend risico de verspreiding van infecties (Knowles et al., 1997; Knowles en Warris, 2007). De impact van het afladen van kalveren en een daaropvolgend verblijf gedurende 24 uur op een verzamelcentrum op gezondheid en welzijn van kalveren is nooit onderzocht; dit is een belangrijke lacune in de kennis. Nielsen et al. (2010) concludeerden in een review dat het niet de transportduur per se is die de oorzaak is van verminderd welzijn van getransporteerde landbouwhuisdieren, maar aspecten die te maken hebben met de kwaliteit van het transport, waaronder bijvoorbeeld thermisch comfort, mogelijkheden om te rusten en de fysiologische en klinische toestand van de dieren. Onder de voorwaarde dat deze omstandigheden optimaal zijn, zouden gezonde en fitte dieren zonder noemenswaardige gevolgen voor gezondheid en welzijn aan langdurig transport onderworpen moeten kunnen worden. Wanneer kalveren jonger dan 4 weken worden getransporteerd, dan wordt in de literatuur geadviseerd om: (i) alleen goed gezonde en fitte dieren aan transport te onderwerpen, (ii) geen tussentijdse rust- en voer-/drinkperiodes in te lassen wanneer het transport naar de uiteindelijke plaats van bestemming niet langer duurt dan 24 uur, (iii) de blootstelling van kalveren aan koude te vermijden, en (iv) onderweg de besmetting met ziektekiemen als gevolg van het mengen van kalveren afkomstig van verschillende transporten te vermijden (Mormède et al., 1982; Knowles, 1995; Knowles et al., 1997, 1999; Knowles en Warris, 2007; Nielsen et al., 2010; Fisher et al., 2014).

Hypothesen:

- Beheersing van het klimaat tijdens transport van jonge kalveren kan ervoor zorgen dat de dieren zich gemakkelijker aan het transport aanpassen, en daar minder (mogelijk negatieve) gevolgen van ondervinden.
- Handhaving van een optimale voedings- en vochttoestand van jonge kalveren rond transport en tijdens de opvang op het vleeskalverbedrijf, ondermeer door de toepassing van nieuwe voedingsstrategieën, in combinatie met een optimaal klimaat op het vleeskalverbedrijf, leidt tot een verhoogd weerstandsvermogen van de dieren, en heeft tot gevolg dat de dieren zich beter aan veranderingen in de omgeving kunnen aanpassen.
- Vanuit het oogpunt van gezondheid en welzijn van jonge kalveren is het beter om af te zien van een gedwongen rustperiode van 24 uur op een Control Post, als onderdeel van lange afstandstransport zoals gedefinieerd in Europese regelgeving.

Transportduur wordt uitdrukkelijk als onderzoeksfactor in het project meegenomen: varianten van lange afstandstransport worden in het onderzoek altijd vergeleken met een kortdurend transport (4 – 6 uur).

3. *Conditie van de moederkoe*

Recent onderzoek toont aan dat de conditie van de koe waaruit een kalf wordt geboren van invloed kan zijn op het functioneren van het kalf na de geboorte. Experimentele studies tonen aan dat ondermeer factoren gerelateerd aan het rantsoen van de (laat) drachtige koe – waaronder, bijvoorbeeld, de hoeveelheid energie, het eiwitgehalte, of de voorziening van mineralen – een effect kunnen sorteren op de groei, het immuunsysteem of het metabole systeem van het zich ontwikkelende kalf vanaf de geboorte (Gao et al., 2012; Osorio et al., 2013; Collazos et al., 2017; Alharti et al., 2018). Verschillen in houderij- en voedingscondities van drachtige koeien vertalen zich ondermeer in verschillen in bepaalde biologisch actieve stoffen in bloed (biomarkers), zoals bijvoorbeeld acute fase eiwitten, NEFA's, mineralen en sporenelementen (Ling et al., 2018). Het identificeren van die specifieke biomarkers in drachtige koeien die een relatie hebben met de gezondheid en vitaliteit van het kalf vanaf de geboorte is niet alleen relevant voor het beter begrijpen van de relatie tussen de conditie van de drachtige koe enerzijds, en de conditie van het kalf anderzijds, maar opent ook de weg naar een betere prenatale diagnostiek waarbij de conditie van de drachtige koe nauwkeuriger en specifiek gestuurd en verbeterd kan worden met het oog op de gezondheid en vitaliteit van het kalf. Dit komt vervolgens ook ten goede aan de kwaliteit van het toekomstige vleeskalf.

Hypothese:

- Verschillen tussen drachtige koeien in specifieke biomarkers in bloed zijn gerelateerd aan de gezondheid en vitaliteit van (vlees)kalveren.

CONTEXT

Met het afschaffen van het melkquotum in 2015 binnen de EU, als reactie op de toegenomen wereldvraag naar zuivel, is de Nederlandse melkveehouderij 5% meer gaan melken en is de verwachting dat de Nederlandse melkproductie komende 5 jaar waarschijnlijk 15% zal stijgen (Rabobank verwacht een groei van 12.5 miljard liter naar 14 miljard liter in 2020). Vorig jaar juli zijn reeds zo'n 10% meer koeien geïnsemineerd. Voor de afvoer van de (hoofdzakelijk mannelijke) kalveren waarvoor in de melkveehouderij geen plaats is zal een maatschappelijk acceptabele oplossing gevonden moeten worden. Een structurele oplossing hiervoor is gevonden in de vleeskalverhouderij. Zoals hierboven reeds aangegeven wordt in het project "Vitaal en gezond kalf in een duurzame veehouderij" ketenbreed onderzoek gedaan naar nieuwe manieren van houderij van kalveren, waarmee de weerbaarheid en het herstellend vermogen van kalveren worden vergroot. In het projectvoorstel wordt een keten-brede aanpak gevolgd, gericht op verbetering van de gezondheidsstatus van (jonge) runderen in de gehele keten (melkveebedrijf en vleeskalverbedrijf). Overall leidt dit tot een meer duurzame rundveehouderij in Nederland en daarbuiten.

Referenties

- Agazzi, A., Tirloni, E., Stella, S., Marocolo, S., Ripamonti, B., Bersani, C., Caputo, J.M., Dell'Orto, V., Rota, N., Savoini, G., 2014. Effects of species-specific probiotic addition of milk replacer on calf health and performance during the first month of life. *Annals of Animal Science* 14, 101-115.
- Alharti, A.S., Batistel, F., Abdelgemeid, M.K., Lascano, G., Parys, C., Helmbrecht, A., Trevisi, E., Loor, J.J., 2018. Maternal supply of methionine during pregnancy enhances rate of Holstein calf development in utero and postnatal growth to a greater extent than colostrum source. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 9: 83.
- Baekke, F., Takiishi, T., Korf, H., Gysemans, C., Mathieu, C., 2010. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology* 10, 482-496.
- Ballou, M.A., Hanson, D.L., Cobb, C.J., Obeidat, B.S., Sellers, M.D., Pepper-Yowell, A.R., Carroll, J.A., Earleywine, T.J., Lawhon, S.D., 2015. Plane of nutrition influences the performance, innate leukocyte responses, and resistance to an oral *Salmonella enterica* serotype Typhimurium challenge in Jersey calves. *Journal of Dairy Science* 98, 1972-1982.
- Brscic, M., Leruste, H., Heutinck, L.F.M., Bokkers, E.A.M., Wolthuis-Fillerup, M., Stockhofe, N., Gottardo, F., Lensink, B.J., Cozzi, G., van Reenen, C.G., 2012. Prevalence of respiratory disorders in veal calves and potential risk factors. *Journal of Dairy Science* 95, 2753-2764.
- Brugman, S., Perdijk, O., van Neerven, R.J.J., Savelkoul, H.F.J., 2015. Mucosal immune development in early life: setting the stage. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 63, 251-268.
- Burdick Sanchez, N.C., Young, T.R., Carrol, J.A., Corley, J.R., Rathmann, R.J., Johnson, B.J., 2013. Yeast cell wall supplementation alters aspects of the physiological and acute phase response of crossbred heifers to an endotoxin challenge. *Innate Immunity* 19, 411-419.
- Collazos, C., Lopera, C., Santos, E.P., Laporta, J., 2017. Effects of the level and duration of maternal diets with negative dietary cation-anion differences prepartum on calf growth, immunity, and mineral and energy metabolism. *Journal of Dairy Science* 100: 9835-9850.

- Chaucheyras-Durand, F., Durand, H., 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes* 1, 3-9.
- Clarke, T.B., Davis, K.M., Lysenko, E.S., Zhou, A.Y., Yu, Y., Weiser, J.N., 2010. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. *Nature Medicine* 16, 228-231.
- Doré, J., Blottière, H., 2015. The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health. *Current Opinion in Biotechnology* 32, 195-199.
- Duff, G.C., Galyean, M.L., 2007. Board-invited review: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 85, 823-840.
- Eicher, S.D., Wesley, I.V., Sharma, V.K., Johnson, T.R., 2010. Yeast cell-wall products containing beta-glucan plus ascorbic acid affect neonatal Bos taurus calf leukocytes and growth after a transport stressor. *Journal of Animal Science* 88, 1195-1203.
- Fisher, A.D., Stevens, B.H., Conley, M.J., Jongman, E.C., Luaber, M.C., Hides, S.J., Anderson, G.A.A., Duganzich, D.M., Mansell, P.D., 2014. The effects of direct and indirect road transport consignment in combination with feed withdrawal in young dairy calves. *Journal of Dairy Research* 81, 297-303.
- Gao, F., Liu, Y.C., Xiang, C.Z., Su, H.W., Li, S.L., 2012. Effect of prepartum energy density on the growth performance, immunity, and antioxidant capability of neonatal calves. *Journal of Dairy Science* 95, 4510-4518.
- Goldhawk, C., Janzen, E., González, L.A., Crowe, T., Kastelic, J., Pajor, E., Schwartzkopf-Genswein, K.S., 2014. Trailer microclimate and calf welfare during fall-run transportation of beef calves in Alberta. *Journal of Animal Science* 92, 5142-5154.
- González L.A., Schwartzkopf-Genswein, K.S., Bryan M., Silasi R., Brown F., 2012. Relationships between transport conditions and welfare outcomes during commercial long haul transport of cattle in North America. *Journal of animal science* 90, 3640-3651.
- Heo, J.M., Opapeju, F.O., Pluske, J.R., Kim, J.C., Hampson, D.J., Nyachoti, C.M., 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97, 207-237.
- Hersom, M., Imler, A., Thrift, T., Yelich, J., Arthington, J., 2015. Comparison of feed additive technologies for preconditioning of weaned beef calves. *Journal of Animal Science* 93, 3169-3178.
- Knowles T., Warriss P., Brown S., Edwards J., Watkins P., Phillips A., 1997. Effects on calves less than one month old of feeding or not feeding them during road transport of up to 24 hours. *Veterinary Record* 140, 116-124.
- Knowles, T.G., 1995. A review of post transport mortality among younger calves. *The Veterinary Record* 137, 406-407.
- Knowles, T.G., and Warriss, P.D., 2007. Stress physiology of animals during transport. In: Grandin, T. (editor), *Livestock Handling and Transport*, 3rd edition. CAB International, Wallingford Oxfordshire, UK, pp. 312-328.
- Knowles, T.G., Brown, S.N., Edwards, J.E., Phillips, A.J., Warriss, P.D., 1999. Effect on young calves of a one-hour feeding stop during a 19-hour road journey. *Veterinary Record* 144, 687-692.

- Ling, T., Hernandez-Jover, M., Sordillo, L., Abuelo, A., 2018. Maternal late-gestation metabolic stress is associated with changes in immune and metabolic responses of dairy calves. *Journal of Dairy Science* 101, 6568-6580.
- Mormède P., Soissons J., Bluthe, R.M., Raoult, J., Legarff, G., Leveux, D., Dantzer, R., 1982. Effect of transportation on blood serum composition, disease incidence, and production traits in young calves. Influence of the journey duration. *Ann Rech Vet* 13(4), 369-384.
- Nielsen, B.L., Dybkjaer, L., Herskin, M.S., 2010. Road transport of farm animals: effect of journey duration on animal welfare. *Animal* 5, 415-427.
- Nonnecke BJ, Foote MR, Miller BL, Fowler M, Johnson TE and Horst RL, 2009. Effects of chronic environmental cold on growth, health, and select metabolic and immunologic responses of preruminant calves. *Journal of Dairy Science* 92, 6134-6143.
- Ollivett, T.L., Nydam, D.V., Linden, T.C., Bowman, D.D., Van Amburgh, M.E., 2012. Effect of nutritional plane on health and performance in dairy calves after experimental infection with *Cryptosporidium parvum*. *JAVMA* 241, 1514-1520.
- Osorio, J.S., Trevisi, E., Ballou, M.A., Bertoni, G., Drackley, J.K., Looor, J.J., 2013. Effect of level of maternal energy intake prepartum on immunometabolic markers, polymorphonuclear leukocyte function, and neutrophil gene network expression in neonatal Holstein heifer calves. *Journal of Dairy Science* 96, 3573-3587.
- Prasad, A.S., 2008. Zinc in human health: Effect of zinc on immune cells. *Molecular Medicine* 14, 353-357.
- Schrama, J.W., Heetkamp, M.J.W., Verstegen, M.W.A., Schouten, W.G.P., van der Veen, F., Helmond, F.A., 1996. Responses of young calves, on two levels of feeding, to transportation. *Animal Science* 63, 79-89.
- Slavin, J., 2013. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients* 5, 1417-1435.
- Smits, M., Jansman, A., Savelkoul, H.F.J., Rebel, A.J.M., 2014. De rol van microbiota voor een evenwichtig afweersysteem. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 6, 22-26.
- Soberon, F., Van Amburgh, E., 2013. The effect of nutrient intake from milk or milk replacer of preweaned dairy calves on lactation milk yield as adults: A meta-analysis of current data. *J Anim. Sci.* 91, 706-712.
- Swanson, J.C., Morrow-Tesch, J., 2001. Cattle transport: Historical, research and future perspective. *J. Anim. Sci.* 79 (E. Suppl.), E102-E109.
- Trompette, A., Gollwitzer, E.S., Yadava, K., Sichelstiel, A.K., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., Blanchard, C., Junt, T., Nicod, L.P., Harris, N.L., Marsland, B.J., 2014. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine* 20, 159-166.
- Uyeno, Y., Shigemori, S., Shimosato, T., 2013. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity 30, 126-132.
- Van Krimpen, M.M, Hulst, M.M., van der Meulen, J., Schokker, D., Savelkoul, H.F.J., Tijhaar, E.J., Rutten, V.P.M.G., 2014. Nutritional intervention in animals: benchmarking of strategies, monitoring biomarkers and immunocompetence. *Rapport Wageningen UR Livestock Research*, 109 pp.
- Vandenplas, Y., 2015. Healthy gut microbiota and long term health. *Beneficial Microbes* 6, 173-179.

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?

ALGEMENE DOELSTELLING

Het algemene doel van het onderzoek is om houderijfactoren en -strategieën te identificeren in het (vroeg) leven van vleeskalveren, waarmee de gezondheidsstatus en het welzijn van de dieren blijvend kan worden verbeterd zodat: (i) op het melkveebedrijf robuuste kalveren worden opgefokt die een goede start maken als toekomstig vleeskalf, (ii) in de vleeskalverhouderij de mortaliteit, morbiditeit en het gebruik van antibiotica in de rundveehouderij afneemt, en (iii) de bedrijfsvoering van de vleeskalverhouderij economisch duurzamer wordt door minder uitval, en betere technische resultaten door de keten heen.

Om dit doel te bereiken zullen de volgende kennisvragen beantwoord moeten worden:

1. Wat zijn de effecten van de (vroeg) huisvesting en voeding op de fysiologische, immunologische en gedragsmatige ontwikkeling van kalveren, en op ziekte-incidentie, antibioticumgebruik, uitval, groei en slachtresultaten van kalveren op het vleeskalverbedrijf, vanaf geboorte tot aan de slachtleeftijd onder praktijkomstandigheden?
2. Wat zijn de effecten van transport en de opvang op het vleeskalverbedrijf op de fysiologische, immunologische en gedragsmatige ontwikkeling van kalveren, en op ziekte-incidentie, antibioticumgebruik, uitval, groei en slachtresultaten van kalveren op het vleeskalverbedrijf, vanaf geboorte tot aan de slachtleeftijd onder praktijkomstandigheden?
3. Welke houderijfactoren in het (vroeg) leven van vleeskalveren zijn van belang voor het ontwerpen van nieuwe of verbeterde versies van bestaande houderijssystemen die: (i) het weerstandsvermogen (robuustheid), de gezondheid en het welzijn van de dieren verbeteren, (ii) ziekte-incidentie, uitval en het gebruik van antibiotica verlagen, (iii) de technische resultaten verbeteren en (iv) daardoor leiden tot een duurzame en maatschappelijk geaccepteerde rundveehouderij.

HAALBAARHEID

Het huidige project is een zogenaamde Publiek-Private-Samenwerking (PPS), met financiering vanuit de vleeskalversector en het Ministerie van Economische Zaken. In het project wordt intensief samengewerkt met de Nederlandse rundveesector (melkvee- en vleeskalversector), veevoedingsbedrijven, producenten van huisvestingssystemen voor kalveren, veetransporteurs, en opvangcentra voor kalveren. Deze partijen zijn deels financier van het onderzoek en leveren daarnaast ook een belangrijke materiële ('in-kind') bijdrage aan het project in de vorm van bedrijven en dieren (plus verzorging), diervoeders, huisvestingssystemen, en logistieke ondersteuning (transport). In het project werken toegepaste en meer fundamentele onderzoekers nauw samen. Daarnaast worden promovendi (aio's) ingezet die betrokken zijn bij de uitvoering van het onderzoek en die de resultaten van het project bewerken tot een academisch proefschrift. Verwacht wordt dat de hierboven omschreven doelen haalbaar zijn binnen de duur van het project. Vertraging zal naar verwachting alleen optreden als door externe omstandigheden, bijvoorbeeld door het optreden van een besmettelijke dierziekte, de melkvee- en kalverbedrijven gedurende een bepaalde periode niet toegankelijk zullen zijn.

3.3 Relevance

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

Het maatschappelijk belang komt tot uiting in de ontwikkeling en implementatie van keten-brede houderijsystemen, gericht op een optimale welzijn en gezondheid van kalveren, een zo laag mogelijk gebruik van diergeneesmiddelen, en een voor de consument veilige en ethisch aanvaardbare manier waarop de dieren worden gehuisvest en verzorgd. Dit draagt bij aan de vermindering van de antibioticumresistentie en dus aan vermindering van het risico voor de volksgezondheid. Daarnaast worden naar verwachting andere aspecten van duurzaamheid (economische prestatie en dierenwelzijn) ook positief beïnvloed, waardoor dit onderzoek bijdraagt aan de ontwikkeling van duurzame veehouderijsystemen.

De wetenschappelijke meerwaarde is dat het hier beschreven project nieuwe kennis genereert over het effect van houderijfactoren tijdens het (vroeg) leven van kalveren op gezondheid en welzijn in latere levensfasen, en over het verband tussen (deels inherent) weerstandsvermogen (robuustheid) van kalveren enerzijds en gezondheid en vitaliteit onder praktijkomstandigheden anderzijds. Meer in het bijzonder wordt inzicht verkregen in (i) relaties tussen nieuwe voedingsstrategieën en weerstand van kalveren, en (ii) het effect van nieuwe transport- en opvangregimes op gezondheid en vitaliteit van kalveren onder praktijkomstandigheden. De kennis die dit onderzoek oplevert wordt niet alleen gepubliceerd in de wetenschappelijke literatuur, maar wordt verder vertaald naar optimalisatie van gangbare en de ontwikkeling van nieuwe houderijsystemen voor fok- en vleeskalveren.

3.4 Research Strategy

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

Algemene strategie

In dit project ligt het accent op de (houderij)omstandigheden tijdens opeenvolgende schakels in de vleeskalverketen voorafgaand aan de mestperiode op het vleeskalverbedrijf, i.c. de (vroeg) opfok van kalveren op het melkveebedrijf van oorsprong en de fase van transport en opvang, en de invloed daarvan op gezondheid en weerstand van vleeskalveren. Daarbij is de algemene onderzoeksstrategie dat kalveren worden vervolgd door de keten heen tot en met het slachten. Daardoor is het mogelijk om uiteindelijk relaties te leggen tussen dierenmerken en behandelingen gemeten en opgelegd tijdens vroege opfok, transport en opvang enerzijds, en de 'performance' van de dieren in termen van ziekte-incidentie, antibioticumgebruik, uitval en groei op het vleeskalverbedrijf anderzijds.

Het project is georganiseerd in een viertal dierexperimenten die worden uitgevoerd onder praktijkomstandigheden (veldstudies), waarin relevante factoren met betrekking tot (vroeg) opfok, transport en opvang van jonge kalveren op het vleeskalverbedrijf systematisch worden gevarieerd, en waarbij relevante uitleesvariabelen met betrekking tot gezondheid en weerstandvermogen bij de onderzochte kalveren worden waargenomen.

De uitleesvariabelen die in dit project gemeten zullen worden hebben betrekking op parameters die (i) licht kunnen werpen op de status van onderliggende biologische systemen die van belang zijn voor het aanpassingsvermogen van kalveren, en (ii) indicatief zijn voor de mate waarin kalveren zich succesvol aan hun omgeving hebben aangepast. Ad (i) hierbij ligt de focus op immunologische en metabole variabelen die een indruk geven van de immunocompetentie en de kwaliteit van de immuunrespons, en van de mate waarin lichaamsreserves worden aangesproken. In het project wordt gezocht naar experimentele behandelingen die de immunocompetentie en de kwaliteit van de immuunrespons van kalveren

verhogen, en waarbij kalveren minder aanspraak hoeven te maken op lichaamsreserves. Ad (ii) het gaat hier om variabelen die in meer directe zin het functioneren van kalveren reflecteren, zoals lichaamsgewicht en groei, de klinische gezondheidstoestand, en het gebruik van diergeneesmiddelen. In het project wordt gezocht naar experimentele behandelingen die gewichtsverlies (bijvoorbeeld ten gevolge van transport) voorkómen of beperken, groei bevorderen, de gezondheid van kalveren verhogen, en het gebruik van diergeneesmiddelen, in het bijzonder antibiotica, verlagen.

Door de structurele betrokkenheid van de (vleeskalver)sector is het in dit project mogelijk om de experimenten onder praktijkomstandigheden uit te voeren. Daardoor worden naar verwachting resultaten behaald die gemakkelijk in de praktijk toegepast kunnen worden.

De uit te voeren dierexperimenten worden opgezet als volledige multifactoriële studies, waarbij de mogelijkheid bestaat om niet alleen hoofdeffecten te schatten, maar ook te kijken naar interacties (bijvoorbeeld tussen voedings-, transport- en opvangregimes). Factoren met betrekking tot bijvoorbeeld voeding en transport worden dan ook tegelijkertijd gevarieerd en onderzocht.

Een belangrijk strategisch kenmerk van het huidige project is de structurele betrokkenheid van de sector bij het onderzoek. De experimenten worden zoveel mogelijk onder praktijkomstandigheden uitgevoerd, zodat de resultaten naar verwachting gemakkelijk in de praktijk toegepast kunnen worden.

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.

Er worden in totaal vier grootschalige dierexperimenten uitgevoerd waarbij, in wisselende samenstellingen, de factoren 'vroeg opfok', 'transport' en 'opvang op het vleeskalverbedrijf' tegelijkertijd worden gevarieerd en bestudeerd. Voor elk van de geplande experimenten is een aparte Bijlage opgesteld. In grote lijnen laten deze experimenten zich als volgt omschrijven:

1. *Het effect van behandeling van jonge kalveren op het opvangcentrum, de wijze van transport en de transportduur op gezondheid en weerstandsvermogen van vleeskalveren*
In dit experiment wordt een volledige 2x2x2 factoriële opzet gehanteerd, met hoofdeffecten: (i) voeding van kalveren voorafgaand aan transport, (ii) mate van klimaatbeheersing tijdens transport, en (iii) duur van transport. Ad (i) Het vertrekpunt van dit experiment is het zogenaamde verzamelcentrum waar kalveren vanaf het melkveebedrijf worden samengebracht alvorens uniforme koppels worden gevormd die vervolgens verder getransporteerd worden naar een vleeskalverbedrijf. Op het verzamelcentrum worden kalveren voorafgaand aan transport onderworpen aan een specifieke voedingsinterventie die erop gericht is om de energie- en eiwitvoorziening te bevorderen. Aldus behandelde kalveren worden vergeleken met kalveren die op een reguliere wijze worden behandeld op het verzamelcentrum. Ad (ii) Klimaat-gecontroleerd transport (ook wel geconditioneerd transport genoemd) van jonge kalveren vindt op dit moment al op kleine schaal in de praktijk plaats met behulp van een aantal geavanceerde vrachtwagens. Samen met wetenschappelijke uitgangspunten met betrekking tot het optimale klimaat van jonge kalveren fungeren deze vrachtwagens als referentiekader voor de definitie van een geconditioneerd transport en de inrichting en uitvoering van de voor dit experiment te gebruiken vrachtwagens. Kalveren worden hetzij op een reguliere wijze, hetzij onder meer gecontroleerde omstandigheden getransporteerd. Ad (iii) Twee nader te bepalen transportduren worden met elkaar vergeleken, een relatief korte transportduur van 6 uur, en een relatief lange transportduur van 18 uur. Kalveren uit deze behandelingsgroepen worden op één of twee vleeskalverbedrijven opgezet, en longitudinaal vervolgd tot het einde van de mestperiode.

2. Het effect van onafgebroken 21 uren-transport in vergelijking met het transporteren van jonge kalveren gedurende 18 uur gevolgd door een rustperiode van 24 uur en een transport van 3 uur

Dit experiment wordt eveneens opgezet als een volledige 2x2x2 factoriële studie. Twee van de drie hoofdeffekten hebben betrekking op, respectievelijk, de voeding van kalveren voorafgaand aan transport en de voeding van kalveren na afloop van het transport, tijdens de opvang op het vleeskalverbedrijf, en aan het begin van de mestperiode. Voor wat betreft de voeding voorafgaand aan transport worden twee strategieën met elkaar vergeleken, gebaseerd op de resultaten van experiment 1. Een optie is dat bij de toepassing van een voedingsregime ter voorbereiding op het transport wordt gestreefd naar het bereiken van een vooraf gedefinieerde (bijvoorbeeld metabole) toestand in het kalf (naar analogie met zogenaamde 'preconditioning' programma's voor vleesvee) (zie (Duff en Galyean, 2007; Schwartzkopf-Genswein et al., 2007). De (klimatologische) omstandigheden tijdens het transport worden gekozen op basis van de uitkomsten van experiment 1.

Voor wat betreft de voeding tijdens de opvang op het vleeskalverbedrijf en aan het begin van de mestperiode worden eveneens twee strategieën met elkaar vergeleken, een reguliere strategie en een alternatieve strategie waarbij gebruik wordt gemaakt van een voedingsinterventie die de immunocompetentie van kalveren zou kunnen verhogen.

De derde behandeling betreft het transportregime, waarbij twee behandelingen met elkaar worden vergeleken: (i) een regulier lange afstandstransport, bestaande uit een transportperiode van 18 uur (twee blokken van, respectievelijk, 9 en 6 uur, met een tussentijdse rustperiode op de vrachtwagen van drie uur), gevolgd door een verblijf van 24 uur op een control post, en een laatste transportperiode van 3 uur naar het kalverbedrijf, en (ii) een ononderbroken 21-uurs transport (zonder het verblijf gedurende 24 uur op een control post), bestaande uit twee transportblokken van 9 uur, met een tussentijdse rustperiode van drie uur op de vrachtauto.

Een aanvullende behandelingsgroep in dit experiment wordt onderworpen aan een kortdurend transport van 6 uur.

3. Het effect van vroege opfok op het melkveebedrijf op gezondheid en weerstandvermogen van vleeskalveren

Dit experiment is onderverdeeld in twee deelstudies. In een eerste deelstudie worden stierkalveren op melkveebedrijven verdeeld over vier behandelingscombinaties behorend tot een volledige 2x2 factoriële studie: twee voerniveau's qua kalvermelk (regulier versus hoog), en twee leeftijden waarop de dieren het melkveebedrijf verlaten (met bestemming een vleeskalverbedrijf). In een tweede deelstudie worden stierkalveren op melkveebedrijven verdeeld over twee voedingsstrategieën, een reguliere strategie en een alternatieve strategie, gebaseerd op de resultaten van experiment 2, waarbij gebruik wordt gemaakt van een voedingsinterventie die de immunocompetentie van kalveren zou kunnen verhogen.

4. Optimalisatie van de opvang en opstart van kalveren op het vleeskalverbedrijf

In het vierde experiment worden op basis van de eerdere bevindingen optimale niveau's van factoren uit de voorgaande experimenten samengebracht in enkele gecombineerde behandelingen (bijvoorbeeld combinaties van leeftijd van kalveren tijdens aanvoer op het kalverbedrijf, wijze van transport, transportduur, voeding op het opvangcentrum, en voeding tijdens de opvang op het vleeskalverbedrijf en het begin van de mestperiode). De vergelijking tussen dergelijke gecombineerde behandelingen heeft het karakter van een systeemvergelijking. In dit experiment bestaat de mogelijkheid om de hygiënische en/of gezondheidsstatus van het vleeskalverbedrijf (vastgesteld op basis van historische data) als extra contrast aan de experimentele design toe te voegen.

Voor alle experimenten geldt dat op een aantal kritische momenten tijdens de ontwikkeling van de kalveren bloedmonsters worden genomen die geanalyseerd worden op een range aan metabole, neuroendocriene en immunologische variabelen. Ook worden gedragswaarnemingen gedaan. Kalveren worden systematisch opgezet op een aantal vleeskalverbedrijven in de praktijk, en longitudinaal vervolgd tot het moment van slachten. Tijdens de mestperiode op het vleeskalverbedrijf worden gegevens verzameld met betrekking tot ziekte-incidentie, antibioticumgebruik, uitval en groei. In het project wordt gekeken in hoeverre de experimentele behandelingen van invloed zijn op de diverse uitleesvariabelen. Daarnaast gaat de aandacht uit naar individuele verschillen tussen dieren waarbij wordt nagegaan wat de relaties zijn tussen uitleesvariabelen binnen en tussen stadia/schakels in de productieketen, voor zover van toepassing op het experiment in kwestie (melkveebedrijf, verzamelcentrum, rond transport, vleeskalverbedrijf).

Referenties

Duff, G.C., Galyean, M.L., 2007. Board-invited review: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 85, 823-840.
Schwartzkopf-Genswein, K.S., Booth-McClean, M.E., Shah, M.A., Entz, T., Bach, S.J., Mears, G.J., Schaefer, A.L., Cook, N., Church, J., McAllister, T.A., 2007. Effects of pre-haul management and transport duration on beef calf performance and welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 108, 12-30.

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

In het hier beschreven onderzoek worden onder praktijkomstandigheden experimentele contrasten aangebracht met betrekking tot de vroege opfok van kalveren op het melkveebedrijf, de opvang van jonge kalveren op het verzamelcentrum, de omstandigheden tijdens transport, en de opvang van kalveren op het vleeskalverbedrijf. Niet alle factoren worden tegelijkertijd in hetzelfde experiment gevarieerd.

De experimenten hebben een logische samenhang; elk volgend experiment borduurt logisch voort op de resultaten uit voorgaande studies. In het eerste experiment ligt het accent op een voerstrategie op het opvangcentrum om kalveren beter voor te bereiden op transport, en op de (klimatologische) omstandigheden tijdens transport. In het tweede experiment ligt het accent op lange afstandstransport, en de opvang van kalveren op het vleeskalverbedrijf. De voerstrategie op het opvangcentrum, en de omstandigheden tijdens het transport in het tweede experiment worden gekozen op basis van de resultaten van het eerste experiment. Met het tweede experiment wordt eind 2017 begonnen. Voor de fasering van het onderzoek is in dit verband relevant dat de resultaten van een andere reeds lopende PPS (het project 'Feed4Foodure') waarin uitgebreid onderzoek is gedaan naar voedingsinterventies die een positief effect hebben op de immunocompetentie en het weerstandsvermogen van landbouwhuisdieren begin 2017 beschikbaar komen. Mede op basis van de stand van zaken binnen Feed4Foodure wordt een keuze gemaakt voor wat betreft een relevante voedingsinterventie die de immunocompetentie van kalveren in het tweede experiment zou kunnen verhogen. In het derde experiment ligt het accent op de vroege opfok van kalveren op het melkveebedrijf. Een voedingsinterventie die in dit vroege stadium van de vleeskalverketen al een positief effect zou kunnen hebben op het weerstandsvermogen van kalveren wordt gekozen op basis van de bevindingen in experiment 2. In het vierde experiment, tenslotte, wordt gestreefd naar een optimale voorbereiding en opstap van kalveren op het vleeskalverbedrijf, als resultante van de best mogelijk voorbereiding van het jonge dier in de voorafgaande schakels (melkveebedrijf, opvangcentrum, transport). De condities in dit experiment worden gekozen op basis van alle tot dan toe behaalde resultaten.

Na ieder experiment is er sprake van een beslissingsmoment ten aanzien van de invulling van het volgende experiment. Binnen de looptijd van het project is de volgende fasering is voorzien:

Jaar 1 en 2 (2017/2018): experiment 1 (aanvang najaar 2017). Keuzemoment invulling experiment 2 (medio 2018).

Jaar 2 (2018): experiment 2 (aanvang medio 2018). Keuzemoment invulling experiment 3 (eind 2018).

Jaar 3 (2019): experiment 3 (aanvang begin 2019). Keuzemoment invulling experiment 4 (medio 2019).

Jaar 3 en 4 (2019/2020): experiment 4 (aanvang medio 2019).

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	Invloed van voedingsniveau op het opvangcentrum en van transportduur en van de condities tijdens transport van vleeskalveren op de performance van deze dieren onder praktijkomstandigheden.
2	Effecten van het voedingsregime voor en na langdurig transport en van de condities tijdens en rondom dit transport van vleeskalveren op de performance van deze dieren onder praktijkomstandigheden.
3	Effecten van de conditie van de moederkoe tijdens de dracht, het voedingsregime van vleeskalveren op het melkveebedrijf en afleverleeftijd op de performance van deze dieren onder praktijkomstandigheden.
4	Effecten van gecombineerde optimalisaties van opvang, transport en opstart van vleeskalveren op de performance van deze dieren onder praktijkomstandigheden.

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 "Vitaal en gezond kalf".

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD4010020172665-1**
2. Titel van het project: Vitaal en gezond kalf
3. Titel van de NTS: Vitaal en gezond kalf
4. Type aanvraag: wijziging van vergunning met nummer AVD4010020172665
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
10.2.e.eng
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 11-02-2019
Aanvraag compleet: 11-02-2019
In vergadering besproken: 18-02-2019
Termijnonderbreking(en) van 18-02-2019 tot 19-02-2019
Aanpassing aanvraag: 19-02-2019
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:
Gestelde vragen en antwoorden:
 - In de projectbeschrijving staat onder 3. Conditie van de moederkoe "Dit komt vervolgens ook ten goede aan de kwaliteit van het toekomstige vleeskalf". De DEC wil weten wat de onderzoeker hiermee bedoelt. Hoe komt dit ten goede? Ook wil de DEC van de onderzoeker weten of dit niet erg opportunistisch is. Er zijn veel factoren die invloed hebben op de kwaliteit van het kalf en de invloed van de moeder zal alleen kort na de geboorte van belang zijn. De DEC kan zich voorstellen dat andere factoren in het verdere opfoktraject een veel grotere (verstorende) invloed hebben dan het effect van de moeder.
Om te beginnen met het laatste punt. Er zijn inderdaad veel factoren die van invloed zijn op de gezondheid van het kalf. Maar juist de laatste jaren wordt steeds duidelijker(aan de hand van talloze wetenschappelijke publicaties) dat ook de prenatale condities van

Wageningen
University & Research

Dierexperimenten
Commissie WUR

DATUM
26 februari 2019

ONDERWERP
aanvraag wijziging
projectvergunning
AVD4010020172665-1

ONS KEUWERK
AVD4010020172665-1

POSTADRES
Postbus 65
8200 AB Lelystad

BEZOEKAADRES
Houtribweg 39
8221 RA Lelystad

INTERNET
www.wur.nl

KVK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON

10.2.e.eng

TELEFOON

10.2.e.eng

E-MAIL
DEC@wur.nl

cruciale invloed zijn op vitaliteit en gezondheid van zoogdieren – inclusief de mens en het rund. Ook blijkt dat de effecten van bepaalde prenatale condities langdurig kunnen zijn, en zich zelfs kunnen uitstrekken tot de volwassen fase van het individu dat aan deze condities heeft blootgestaan. Mechanismen die hier ondermeer aan ten grondslag liggen hebben betrekking op de prenatale programmering van belangrijke biologische mechanismen in het ongeboren individu, zoals het metabole systeem, het neuroendocriene systeem (b.v. als het gaat om de manier waarop later met stress kan worden omgegaan), en het immuunsysteem. Epigenetische processen spelen hierbij een belangrijke rol. Ik zou het verzoek om in ons experiment ook bloedonderzoek te doen bij de drachtige moederdieren beslist niet willen afdoen als 'opportunistisch'. Aan dit verzoek ligt een oprechte en ons inziens relevante wetenschappelijke vraag ten grondslag.

Vanuit de gedachte dat prenatale condities een effect kunnen hebben op het kalf is de redenering dat dit dan ook geldt voor het vleeskalf. Dat wat het latere vleeskalf prenataal en (vroeg) postnataal heeft 'meegemaakt' op melkveebedrijf van oorsprong is ook relevant voor gezondheid, groei, en aanpassingsvermogen op van het dier het vleeskalverbedrijf. Kalveren gaan doorgaans al op een leeftijd van ca. 2 weken naar het vleeskalverbedrijf gaan, en gelet op het feit dat veel gezondheidsproblemen bij vleeskalveren zich voordoen tijdens de eerste weken na aankomst op het vleeskalverbedrijf – dus op jonge leeftijd – is het helemaal niet ondenkbaar dat prenatale en (vroeg) postnatale condities belangrijk zijn voor de gezondheid van het vleeskalf.

- *Onder Vermindering wil de DEC dat de onderzoeker opneemt dat men de bloedafnames bij de moederdieren stopt op het moment dat men voldoende kalveren geïncludeerd heeft in het onderzoek. Dit is aangepast in Bijlage 3.*
- *In de hele wijziging ontbreekt op diverse plaatsen het geringe ongerief van de moederdieren. Dit is aangepast in het Projectvoorstel en in Bijlage 3 (aangegeven in rood).*
- *In het bloed van de kalveren worden veel meer parameters bepaald dan in het bloed van de moederdieren. De DEC wil weten of de beperkte parameters die bij de moederdieren bepaald worden voldoende informatie geven. Dit lijkt erg beperkt voor het bepalen van biomarkers. Zouden bijv. niet immunologische parameters meegenomen moeten worden?*

Gelet op de beschikbare literatuur vertegenwoordigen de variabelen die in bloed van moederdieren worden bepaald een zinvolle en biologisch relevante set. Wij hebben een zo goed mogelijk keus willen maken, omdat we ook voldoende focus wilden houden, en tevens praktisch gezien niet alle denkbare parameters in het onderzoek mee kunnen nemen. We praten in de huidige set variabelen niettemin over een aanzienlijk aantal individuele parameters, die in ieder geval cruciale aspecten van de prenatale conditie van de moederkoe betreffen: de metabole status, en de status van het afweersysteem daar waar het gaat om de aan- of afwezigheid van een afweerproces. Sporenelementen en mineralen zijn tot op heden nog relatief onderbelicht gebleven parameters waar echter wel van wordt aangenomen dat ze van belang kunnen zijn voor het ongeboren kalf. Dit aspect gaan we in dit experiment specifiek onderzoeken. Daarmee hopen we een waardevolle bijdrage te kunnen leveren aan de groeiende kennis op het terrein van de relatie tussen postnataal biologische functioneren van zoogdieren (i.c. kalveren) en prenatale condities.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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 wijziging op een bestaande vergunning. De DEC-beoordeling (C) en het DEC-advies (D) zijn onveranderd gebleven t.o.v. het oorspronkelijke advies d.d. 28-08-2017 (hieronder weergegeven), met uitzondering van de rode tekst die betrekking heeft op de nu aangevraagde wijziging.
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 doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is uit te splitsen in 4 onderdelen:
 - Invloed van voedingsniveau bij het opvangcentrum en de transportduur en -condities tijdens transport van vleeskalveren op de performance van deze dieren onder praktijkomstandigheden;
 - Effecten van het voedingsregime voor en na langdurig transport en van de condities tijdens en rondom dit transport van vleeskalveren op de performance van deze dieren onder praktijkomstandigheden;
 - Effecten van het voedingsregime van vleeskalveren op het bedrijf van herkomst en aflever-leeftijd op de performance van deze dieren onder praktijkomstandigheden;
 - Effecten van gecombineerde optimalisaties van opvang, transport en opstart van vleeskalveren op de performance van dieren onder praktijkomstandigheden.

Het uiteindelijke doel van de aanvraag is een bijdrage leveren aan het creëren van een gezond kalf met een beter welzijn, in een beter, maatschappelijk geaccepteerd houderij-systeem.

In de DEC is gediscussieerd of er sprake is van een nieuwe doelstelling. Er wordt namelijk een hypothese aan het huidige project toegevoegd. De DEC is van mening dat de aangevraagde wijziging zo logisch in het verlengde van de vergunning ligt dat te rechtvaardigen is dat dit onder het huidige project geplaatst wordt in plaats van een nieuwe aanvraag met een nieuwe doelstelling. Een nieuw aanvraag zou ook tot meer proefdieren leiden omdat een deel van het onderzoek met de kalveren ook overgedaan moet worden op de koppeling tussen koe en kalf te kunnen maken. De DEC acht het daarom aanvaardbaar de wijziging als onderdeel van de reeds vergunde aanvraag te toetsen omdat dit een aanzienlijke reductie van het aantal dieren (de kalveren) met matig ongerief zal opleveren.

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
 - Doeldieren: welzijn en gezondheid
 - Veehouder: economisch belang

- Onderzoeker/CRO: economisch belang
- Producent interventies: economische belang
- Maatschappij: een geaccepteerd houderijsysteem

6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding voor de DEC 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, het horen van de aanvrager en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn.

8. De opzet is ingewikkeld beschreven en er is veel overlap tussen de bijlagen. De DEC merkt op dat de nadruk steeds ligt op multifactorieel onderzoek en discussieerde hierover.

Zij komt tot de conclusie dat in de praktijk ook sprake is van een multifactorieel proces en dat wanneer men individuele factoren zou onderzoeken dit minder zeggingskracht voor de praktijk zal hebben. In de ogen van de DEC weegt deze grotere zeggingskracht op tegen de mogelijke risico's met betrekking tot de haalbaarheid van het project.

Welzijn dieren

9. De dieren verblijven op praktijkbedrijven buiten de instellingsvergunning. De reden hiervoor heeft de onderzoeker goed onderbouwd: juist deze geïntegreerde aanpak zorgt voor meerwaarde van het onderzoek.
10. Gevolg hiervan is dat de huisvesting niet voldoet aan de Wod. De verzorging van de dieren wordt gedaan door de kalverhouder. Biotechnische handelingen zullen uitgevoerd worden door gekwalificeerde en ervaren biotechnici.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: (langdurig) transport, verblijf op de Control Post, bloedafname en toedienen van vaccin/antigeen.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen.
13. Er zijn in het project geen specifieke HEP's geformuleerd. Indien zich problemen voordoen worden die conform Good Veterinary Practice behandeld. De DEC kan zich hier in vinden.

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.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Wanneer er voldoende kalveren geïncubeerd zijn in het project wordt de bloedafname bij de moederdieren gestopt.
16. De DEC vraagt zich af of immunisatie bij 3 van de 5 dieren echt als een verfijning gezien kan worden. De DEC ziet echter geen verdere mogelijkheden om verfijning toe te passen.

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. Omdat de experimenten op praktijkbedrijven uitgevoerd worden, worden er enkel mannelijke dieren ingezet. Omdat het dieren uit de gangbare houderij betreft heeft dit geen surplusdieren tot gevolg.
19. De dieren worden niet gedood in het kader van het project maar worden na afloop van het experiment commercieel geslacht en vermarkt.

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.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: weegt het onderzoek met vleeskalveren met de vergelijking standaard- en verbeterde omstandigheden op tegen het ongerief dat de proefdieren ondervinden?
2. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een complexe aanvraag, maar dat de structuur die de ketenbenadering met zich meebrengt het project voldoende samenhang geeft.

De aanvraag leidt in elk geval tot kennis over mogelijkheden tot betere welzijnsomstandigheden in de kalverhouderij. Deze kennis heeft ten eerste meerwaarde voor de onderzoeker. In haar afweging heeft de DEC deze waarde van kennis beoordeeld als een reëel belang voor de onderzoeker aangezien het informatie oplevert die op dit moment nog niet of zeer beperkt beschikbaar is. Daarnaast is deze kennis ook relevant voor de sector. Deze heeft een economisch belang en is gebaat bij betere welzijnsomstandigheden in de kalverhouderij. Naast directe economische belangen speelt ook maatschappelijke waardering een rol. Kennis kan ingezet worden, zodat de sector beter gedragen wordt door de maatschappij. De DEC ziet beide onderdelen als een reëel belang. Als het project zijn doel bereikt, heeft het ook invloed op de toekomstige kalveren. Het gaat hierbij om de waarden van gezondheid en van welzijn. De meerwaarde die dit project gaat bieden is echter op dit moment nog lastig in te schatten. Het uiteindelijk doel is gericht op een positief effect voor de vleeskalveren. De DEC onderschrijft de relevantie van de waarde van dierenwelzijn. Het is echter niet volledig uit te sluiten dat kennis uit dit project ook ingezet kan worden op een wijze die voor de dieren geen voordeel oplevert. In de toekomstige toepassing van de kennis van dit project zullen immers ook andere belangen, waaronder het economisch belang voor de sector een belangrijke rol spelen, hetgeen op gespannen voet kan staan met welzijnsverbeteringen voor de dieren. De DEC heeft dit expliciet in haar oordeel laten meewegen, maar is ook van mening dat:

(a) de huidige transportpraktijk een negatief effect heeft op het dierenwelzijn. Hoewel de vrachtwagens en transporten aan eisen moeten voldoen is de vraag of dit voor de dieren ook tot welzijnsverbetering leidt. De DEC deelt de mening van de onderzoekers dat in het bijzonder de controleposten niet zorgen tot welzijnsverbetering: stress (afladen, opladen, vreemde omgeving), overdracht van ziektes, geen aandacht voor het individuele dier op bijv. drinken.

(b) de onderzoekers van het project gericht zijn op het zoeken naar een situatie die verbetering voor de dieren impliceert.

Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Zij ervaren maximaal matig ongerief als gevolg van de handelingen binnen dit project.

Bij het aspect alternatieven, heeft de DEC stil gestaan bij de vraag of dit onderzoek vervangen kan worden door in de praktijk de dieren af te mesten in het land van herkomst/dichter bij Nederland. Dit heeft als voordelen dat er geen lange transporten uitgevoerd hoeven te worden en dat de verspreiding van ziektes beperkt wordt. De DEC realiseert zich dat (a) dit geen alternatief is voor het gestelde doel van de aanvraag, (b) het dierenwelzijn in de herkomstlanden mogelijk lager zal zijn in vergelijking met Nederland en (c) dat een dergelijk alternatief verregaande wijzigingen in de sector veronderstelt, die enerzijds juist extra kennis veronderstelt en anderzijds voorbij de scope van dit onderzoek en het mandaat van de DEC gaan (zie ook E3).

DATUM
26 februari 2019

ONS KENMERK
AVD4010020172665-1

PAGINA
5 van 6

DATUM

26 februari 2019

ONS KENMERK

AVD4010020172665-1

PAGINA

6 van 6

3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat gegeven de huidige trans-portpraktijk en de huidige infrastructuur van de kalverhouderij het project relevante kennis kan opleveren voor onderzoekers, sector en dieren. Op basis hiervan is het ethisch verantwoord om onderzoek te doen naar verbeteringen in de vleeskalverhouderij met maximaal matig ongerief voor 2014 dieren en maximaal gering ongerief voor maximaal 1176 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.

Met vriendelijke groet,

10.2 .e. en g

secretaris DEC WUR



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Wageningen Research
t.a.v. 10.2.e.eng
Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD4010020172665-1

Datum 22 maart 2019
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven
Geachte 10.2.e.eng

Bijlagen
1

Op 7 februari 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Vitaal en Gezond Kalf" met aanvraagnummer AVD4010020172665, waarvoor op 13 oktober 2017 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD4010020172665-1. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u dieren toe te voegen aan de vergunning. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Vitaal en Gezond Kalf" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie (hierna: de DEC) DEC-WUR. Dit advies is ontvangen op 26 februari 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet.

Nadere vragen

Op 8 maart 2019 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op het aantal 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 vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Vergunning

Uw vergunning wijzigt als volgt:

Datum
22 maart 2019
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD4010020172665-1

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren gewijzigd	Ernst
3.4.4.3 Effecten van het voedingsregime van vleeskalveren op het melkveebedrijf en afleverleeftijd op de performance van deze dieren onder praktijkomstandigheden			
	Runderen	2014 kalveren + 1176 koeien	Matig Licht

Voor het overige blijft uw vergunning ongewijzigd.

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 93118, 2509 AC 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 gegevens in het colofon.

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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:

10.2.e.eng

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen
- DEC-advies



20172207-4

Centrale Commissie Dierproeven

Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 50100
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. TNO
- 1.3 Vul de titel van het project in. Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. *in vivo* fibrose modellen.

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 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).

- Geef in geval van 'hogere onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Fibrose is een pathologisch proces waarbij een overmatige vorming van fibreus bindweefsel in organen of weefsels optreedt. Fibrose kan gezien worden als een uit de hand gelopen wondhelingsproces, waarbij er een dusdanig zeer sterke ophoping van bindweefsel kan optreden dat het normaal functioneren van het orgaan niet meer mogelijk is. Hierdoor kan fibrose tot ernstige gezondheidsproblemen leiden en heeft levensbedreigende aspecten als het bijvoorbeeld de long, lever of nier betreft. Hoewel de klinische noodzaak om fibrose te kunnen behandelen overduidelijk is (er wordt geschat dat in 45% van alle sterfgevallen fibrose een rol heeft gespeeld) waren er tot enkele jaren geleden geen behandelmethoden beschikbaar.

Met het op de markt komen van twee (zij het nog maar zeer matig effectieve) medicijnen tegen longfibrose (Pirfenidone door Roche en Nintedanib door Boehringer Ingelheim) is het fibrose onderzoek de afgelopen jaren in een enorme stroomversnelling geraakt. Zowel binnen de farmaceutische industrie als binnen de academia worden momenteel nieuwe medicijnen ontwikkeld die de hoop bieden dat binnen afzienbare tijd nieuwe therapiemogelijkheden beschikbaar komen. Dit wordt ondersteund door het feit dat hoewel er grote verschillen tussen de organen kunnen zijn in factoren die fibrose kunnen veroorzaken, er een grote overlap in de processen is als het fibroseproces eenmaal op gang is. Dit betekent dat bijvoorbeeld een therapie die ontwikkeld is voor de behandeling van longfibrose vaak ook effect in andere orgaanfibroses kan hebben.

Een essentiële stap in het testen van nieuwe farmaca is het aantonen van effectiviteit in een preklinische setting voordat ze in een klinische fase verder getest zullen gaan worden. TNO heeft de afgelopen 15 jaar een breed portfolio van *in-vivo* en *in-vitro* modellen ontwikkeld waarin we fibrose in verschillende organen kunnen nabootsen. Middels ons portfolio ondersteunen wij zowel de farmaceutische industrie als de academische wereld bij het zo goed mogelijk testen van nieuwe therapie mogelijkheden. Omdat het onderzoek naar nieuwe anti-fibrotische therapieën nog een relatief jong onderzoeksveld is, vinden er voortdurend verbeteringen aan modellen en uitleesmogelijkheden plaats. Wij streven ernaar om deze zo goed mogelijk in ons portfolio te incorporeren om daarmee een zo optimaal mogelijk preklinisch palet aan te bieden.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het hoofddoel van dit project is het testen van nieuwe anti-fibrotische therapie mogelijkheden in state-of-the-art long-, huid-, lever en/of nier fibrosemodellen die zo goed mogelijk bijdragen aan het voorspellen van de uiteindelijke klinische effectiviteit.

Om dit mogelijk te maken zijn de volgende subdoelen in dit project geïntegreerd:

- Continue validatie en verdere optimalisatie van de modellen (bijvoorbeeld door het toevoegen van extra read-out mogelijkheden, het uittesten van nieuwe toedieningsstrategieën, het ontwikkelen van meer chronische varianten van onze modellen om daarmee de humane klinische situatie beter te benaderen en het uittesten van potentiële nieuwe positieve controles).
- Ontwikkelen van kennis over het fibrotische proces in de verschillende modellen (bijvoorbeeld het volgen van de fibroseontwikkeling in de tijd of het vergelijken van fibrotische processen tussen dier en mens om daarmee optimale translatie mogelijk te maken).

Dit project heeft een hoge haalbaarheid:

TNO heeft een zeer uitgebreid track record op dit gebied. Onderzoekers binnen de groep zijn al meer dan 20 jaar werkzaam op het gebied van extracellulaire matrix aanmaak en afbraak. Daarnaast heeft TNO sinds 10 jaar een uitgebreid programma op het onderzoeken en testen van nieuwe anti-fibrotische

therapie mogelijkheden. Hierbij is een groot netwerk binnen zowel de academische wereld als binnen de farmaceutische industrie opgebouwd. Binnen dit netwerk hebben we de afgelopen 10 jaar meer dan 50 samenwerkingsprojecten (zowel bilateraal als in grotere consortia) uitgevoerd.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Er is géén therapie beschikbaar ter voorkoming van fibrose, terwijl de behandeling met de momenteel beschikbare farmaca slechts matig effectief is in zowel de patiënt als in de muis.

Fibrose is een chronische aandoening die tot ernstige gezondheidsproblemen kan leiden en heeft levensbedreigende aspecten als het de long, lever of nier betreft. Hoewel de klinische noodzaak om fibrose te kunnen behandelen overduidelijk is (45% van alle mortaliteit heeft een fibrotische component) zijn er nog nauwelijks goede behandelmethoden beschikbaar.

Bovenstaande doelstellingen zullen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen tegen fibrose. Deze zullen leiden tot een aanzienlijke verbetering en verhoging van de kwaliteit van leven, enorme kostenbesparing in de zorg en meer arbeidsparticipatie van fibrosepatiënten.

Om dit mogelijk te maken is het essentieel dat de bestaande wetenschappelijke kennis over het ontstaan van fibrose en de daarvoor verantwoordelijke processen verder uit te breiden:

Longfibrose wordt gekenmerkt door kortademigheid, infiltraten (te zien op röntgenfoto) en ontsteking/fibrosis. Als de longfunctie vermindert neemt de sterfte toe. 50-70% van de patiënten met longfibrose sterft binnen 5 jaar na de diagnose. Per jaar worden 12 op de 100.000 mensen gediagnostiseerd met idiopathische longfibrose.

Leverfibrose wordt vaak gezien in obese of hepatitis B of C besmette patiënten. Het duurt jaren voordat de ziekte zich ontwikkelt en klinische signalen worden herkend. 10 tot 20% van alle patiënten gediagnostiseerd met leverfibrose zullen uiteindelijk sterven aan cirrose of leverkanker als er niet wordt overgegaan op een levertransplantatie. Bij 25% van de hepatitis geïnfecteerde patiënten met een levertransplantatie keert de fibrose/cirrose weer terug. Wereldwijd lijden 400 miljoen mensen aan leverfibrose.

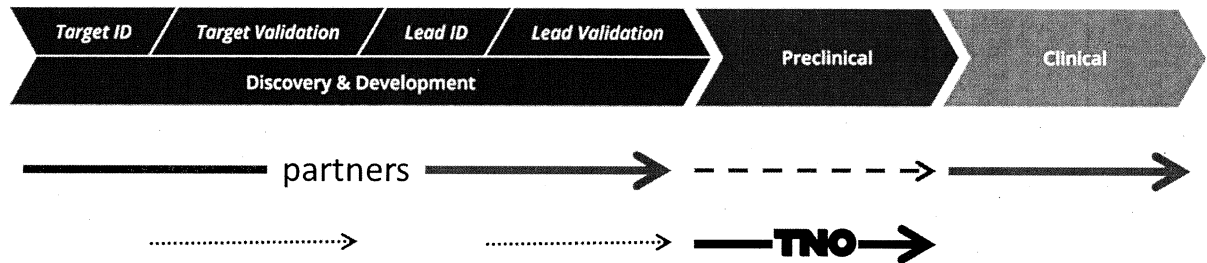
Chronisch nierfalen kan ontstaan door meerdere oorzaken, zoals diabetes of hypertensie. Eén van de kenmerken van eindstadium nierfalen is de ontwikkeling van fibrose in de verschillende compartimenten in de nier. Wanneer de nier is beschadigd, ontstaat een ontsteking die zich kan ontwikkelen tot 'end stage' *nierfibrose*. De ontstane nefropathie veroorzaakt veel sterfte binnen de diabetes en obese patiënten populatie. Er is geen goede therapie voor nierfalen en de enige behandeling die op dit moment werkt is dialyse of niertransplantatie. Helaas is dit geen lange termijn oplossing. Geschat wordt dat in 2020 drie miljoen Nederlanders diabetes hebben, 44% van deze patiënten zal nefropathie en leverpathologie ontwikkelen.

Ook huidfibrose (bijvoorbeeld in het ziektebeeld systemische sclerodermie of na verbranding) kan leiden tot ernstige gezondheidsproblemen. In handen en gezicht komt deze ziekte het meest voor. Samentrekking van bindweefsel kan daar leiden tot een sterk verlies van functie in de hand en de mond.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Het ontwikkelen van nieuwe therapeutica verloopt volgens een vast stramien:



Allereerst worden er geschikte targets geïdentificeerd op basis van bijvoorbeeld literatuur, humane studies en/of *in vitro* testen. Vervolgens wordt gevalideerd of modificatie van het target inderdaad tot verandering van pathologie kan leiden (bv *in vitro* testen, *ex vivo* testen met humaan weefsel, *in vivo* testen in transgene dieren). Hierna worden stoffen (leads) ontwikkeld die het target kunnen beïnvloeden (bv remmende antilichamen, small molecules, RNA therapie) en worden deze leads gevalideerd (welke stof is het meest potent, hoe is de oplosbaarheid, hoe specifiek is de stof). De meest veelbelovende kandidaten gaan vervolgens door naar de preklinische testfase, waarin wordt onderzocht of de kandidaat stoffen goed genoeg zijn om in de mens getest te worden (klinische fase). Het ultieme doel hierbij is natuurlijk dat stoffen die ook de klinische fase met succes doorlopen als nieuwe therapie zullen worden toegelaten.

TNO ondersteunt als Research and Technology Organization (RTO) al jaren zowel de farmaceutische industrie als academische partners bij het uitvoeren en optimaliseren van preklinisch onderzoek op het gebied van fibrose. Omdat het uitvoeren van dit soort onderzoek bij TNO goed gevalideerd is en het vaak om specialistische modellen gaat, kiezen veel partners ervoor dit soort onderzoek in samenwerking te doen in plaats van zelf uit te voeren. Belangrijk hierbij is te realiseren dat het voor partners vaak van even groot belang is om te leren dat een stof niet werkt (en dus niet door kan naar de klinische fase) als om aan te tonen dat een stof wel werkt. Het overgrote deel van het werk onder dit project valt in de preklinische fase, maar werk op het gebied van target validatie (bv aantonen dat een pathway betrokken is in fibrose d.m.v. het gebruik van transgene dieren) of lead validation (bv vergelijken van verschillende varianten van een nieuwe stof om daarna te kunnen kiezen welke stof verder ontwikkeld zal worden) vindt ook plaats.

Voor het testen van nieuwe geneesmiddelen die de fibrosevorming verminderen, maken wij gebruik van 4 diersmodellen. Uit uitgebreide literatuurstudie en na intensieve consultatie met farmaceutische partijen en academische partners is naar voren gekomen dat deze modellen op dit moment het best gevalideerd en geaccepteerd zijn (ook door de FDA) voor het preklinisch testen van nieuwe therapie mogelijkheden. Het betreft hier de volgende modellen:

- Bleomycine-geïnduceerde longfibrose
- Bleomycine-geïnduceerde huidfibrose
- CCl₄-geïnduceerde leverfibrose
- Ureter obstructie geïnduceerde nierfibrose

Het overgrote deel (>80%) van de studies die onder deze projectaanvraag zullen worden uitgevoerd zullen effectiviteit studies zijn waarin nieuwe therapeutica worden getest. Dit zal in samenwerking met of in opdracht van externe partners plaatsvinden. Voor elke individuele studie wordt uitgebreid met de betreffende partner overlegd over het optimale studiedesign. Er wordt altijd aan de partner gevraagd wat er al bekend is van het te testen middel, om zo onnodig proefdier gebruik te voorkomen. TNO heeft voor verschillende modellen uitgebreide datasets beschikbaar waarin kan worden gekeken of de targets inderdaad betrokken zijn. Verder komen hierbij ook aspecten als keuze van het meest geschikte model (meestal gebaseerd op het werkingsmechanisme of het toepassingsgebied), de experimentele opzet, de toedieningsroute, de behandelingsfrequentie, de poweranalyse, de concentratie keuze, de uitleesparameters, etc. aan de orde.

Hoewel bovenstaande modellen op dit moment het meest geschikt geacht worden voor het testen van nieuwe therapie mogelijkheden betekent dit niet dat er geen knelpunten binnen het fibrose onderzoek meer zijn. Daarom zullen de resterende studies die onder deze projectaanvraag zullen worden uitgevoerd zich

richten op het continue verder verbeteren van deze modellen. De hoofdknelpunten waar we op ons zullen richten zijn:

- Verbeteren reproduceerbaarheid en verbeteren validatie van de modellen: in de uitgebreide literatuur over deze modellen worden veel varianten gebruikt die niet allemaal gelijkwaardig zijn. In het verleden hebben we de reproduceerbaarheid van het longfibrose model al sterk kunnen verbeteren door de toedieningsroute van bleomycine te veranderen van intratracheale injectie naar oropharyngeale toediening. We proberen continu de modellen te verbeteren en tegelijkertijd de modellen zo goed mogelijk te valideren. Hier zal onder andere ook worden gekeken of het mogelijk is om verschillende modellen te combineren (inductie van longfibrose in het huidfibrosemodel), zodat er meer kennis met minder dieren kan worden gegenereerd.
- Verbeteren van beschikbare uitleesparameters: veel van de klassieke uitleesparameters zijn gericht op het meten van het collageen eiwit (histologie, biochemische analyses). Deze hebben als nadeel dat ze vaak weinig onderscheidend zijn (de therapie werkt/werkt niet). Wij richten ons daarom ook op meer gevoelige methodes die de processen beter in kaart kunnen brengen (bijvoorbeeld -omics benaderingen). Hiermee hopen we in de toekomst verschillen tussen nieuwe therapiemogelijkheden beter te kunnen differentiëren. Daarnaast heeft het ontwikkelen van nieuwe uitleesparameters die het beter kunnen bepalen van werkzaamheid in een therapeutisch behandelprotocol kunnen versterken. In het verleden hebben we hier al stappen kunnen zetten door het toepassen van zwaar water labeling van nieuw collageen.
- Verbeteren van kennis over het fibroseproces in muis en rat en het vergelijken van deze processen met het humane ziektebeeld. Deze kennis zal gebruikt worden om beter te kunnen onderzoeken wat de overlap en de verschillen tussen de model ziekte en het humane ziekteproces te kunnen bepalen. Hiermee zal een verbeterde translatie naar de kliniek kunnen plaatsvinden. Daarnaast zal deze kennis worden gebruikt om beter advies te kunnen geven over de opzet van de proeven. Zo zal bijvoorbeeld meer gedetailleerde kennis over het tijdsverloop van de modellen kunnen bijdragen aan een beter ontwerp van een therapeutisch regime (bv bepalen wat het optimale moment om te starten van een behandeling gebaseerd op kennis van het werkingsmechanisme van de nieuwe therapie).

Bij vraag D van de verschillende bijlagen zijn voorbeeldstudies gegeven om duidelijker te maken op welk gebied deze verbeteringen kunnen liggen.

Alle studies worden uitgevoerd conform de richtlijnen van de "good practice guide" (van Diehl *et al*, J Appl Toxicol. 2001 Jan-Feb;21(1):15-23.) en worden voor aanvang eerst door de IvD getoetst.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

1) Testen van nieuwe anti-fibrotische therapieën

Binnen ons netwerk (farmaceutische industrie, academische partners) worden veel nieuwe behandel mogelijkheden voor fibrotische aandoeningen ontwikkeld. Veel van onze partners hebben zelf niet de kennis/capaciteit in huis om deze nieuwe therapieën op effectiviteit te testen en maken gebruik van onze expertise om deze testen uit te voeren. Therapieën die worden ontwikkeld zijn o.a. small molecules, antilichamen, celtherapie, antisense technologieën. Daarnaast kan bijvoorbeeld het belang van een bepaalde pathway worden onderzocht door gebruik te maken van transgene dieren, dit kan vooral van belang zijn als er nog geen andere mogelijkheden zijn om deze pathways te moduleren.

2) Instandhouding lopende diermodellen

De batches bleomycine die wij gebruiken voor het induceren van huid of longfibrose hebben een verschillende werkzaamheid. Dit betekent dat bij elke nieuwe batch bepaald moet worden bij welke concentratie het fibrose inductie window voldoende hoog is. Voor de huid en longfibrose modellen worden verschillende batches gebruikt. De gevoeligheid varieert ook per species en potentieel per stam. Afhankelijk van het aantal daadwerkelijk uitgevoerde studies zal er naar schatting elke 3 jaar een nieuwe batch getest moeten worden.

3) Verbetering modellen/read-outs

Op basis van contacten binnen ons uitgebreide netwerk, de nieuwste literatuur en ons eigen programma gericht op het continu aanbrengen van verbetering in de modellen, zal er steeds worden gestreefd met zo min mogelijk dieren en zo min mogelijk ongerief maximaal inzicht te krijgen in het ontwikkelen van nieuwe therapieën.

Hierbij zullen onder andere de volgende vragen worden geadresseerd:

- Is het mogelijk de milde longfibrose die in het huidfibrose model optreedt meer consistent tot expressie te laten komen zodat beide pathologieën in hetzelfde model kunnen worden onderzocht? (Zodat niet twee afzonderlijke modellen hoeven worden uitgevoerd, dit geeft vermindering van aantallen dieren in studies).
- Is het mogelijk het transiënte fibroseproces in het longfibrose model met behulp van meerdere inductiemomenten meer de humane ontwikkeling te laten doormaken? Zo ontstaat een meer chronisch dan acuut longschade model, dit is beter transleerbaar naar de kliniek.
- Verfijning van toedieningsmogelijkheden. Bijvoorbeeld de manier van het induceren van de fibrose, of het systemisch toedienen van therapeutica.

4) Verdere ontwikkeling kennis over modellen

Meer beschikbare kennis over de modellen draagt bij aan het optimaliseren van het studiedesign voor het testen van nieuwe therapeutica.

Voorbeelden hiervan zijn:

* Bepaling van werkzaamheid van erkende referentiestoffen

* Het maken van een transcriptoom database door de tijd heen; hierin kunnen partners voordat ze een dierstudie gaan inzetten controleren of hun nieuwe targets wel in de modellen voorkomen: dit geeft uiteindelijk vermindering van het aantal dierproeven.

* Ontwikkelen van meer kennis over eventuele herstelprocessen die plaatsvinden na fibrose inductie; dit geeft meer inzicht of het mogelijk is om fibrose daadwerkelijk te genezen ipv de verdere ontwikkeling te remmen.

* Hoe is het microbiom betrokken bij de ziekte?

* Biomarkers zoeken in plasma die voorspellend zijn voor de mate van fibrosevorming

* Vergelijking van de gegeneerde data uit de diermodellen met humane longfibrose patiënt gegevens, om zo de voorspelbaarheid vanuit de modellen naar de kliniek te optimaliseren.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Alle onderdelen van deze projectaanvraag zijn erop gericht om zo optimaal mogelijk (maximale voorspelbaarheid naar de kliniek gecombineerd met minimaal proefdiergebruik) te beoordelen of nieuwe therapieën preklinische effectiviteit laten zien en daarmee geschikt zijn voor verdere klinische ontwikkeling. Hierbij wordt gebruik gemaakt van vier verschillende diermodellen voor fibrose die tezamen het overgrote deel van de humane klinische ontwikkelingsgebieden afdekken.

Door een proces van voortschrijdende validatie en verdere doorontwikkeling wordt ernaar gestreefd om te allen tijde de best mogelijke studiedesigns te kunnen aanbieden.

Afhankelijk van het aanbod van te testen nieuwe therapieën kunnen er tussen de jaren verschillen optreden in de inzet van de verschillende diermodellen. Hierdoor kan ook een verschil in ratio van gebruikte mannetjes vs gebruikte vrouwtjes ontstaan. Op grond van ervaringen van de afgelopen jaren zal dit rond de 75/25% liggen, maar verschuivingen hiervan zijn mogelijk.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Longfibrose in muis of rat
2	Nierfibrose in muis of rat
3	Huidfibrose in muis of rat
4	Leverfibrose in muis of rat
5	
6	
7	
8	

9	
10	

Aanvullingen voor wijziging 4 in blauw

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD5010020172207-4
2. Titel van het project : Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen.
3. Titel van de NTS : Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces in diermodellen

4. Type aanvraag: gewijzigd naar 'wijziging'

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer: AVD5010020172207

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : 10.2 .e. en g

Telefoonnummer contactpersoon: 10.2 .e. en g

Emailadres contactpersoon: 10.2 .e. en g

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 23/11/20
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken:
- anderszins behandeld: schriftelijk
- termijnonderbreking(en) van / tot :
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 3 dec 2020

7. De aanvraag is afgestemd met de lvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

- Datum: n.v.t.
- Plaats: n.v.t.
- Aantal aanwezige DEC-leden: n.v.t.
- Aanwezige (namens) aanvrager: n.v.t.
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: n.v.t.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag. n.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager: n.v.t.

- Datum vragen:

- Datum antwoord:
- Gestelde vragen en antwoorden:
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- Aard expertise: n.v.t.
- Deskundigheid expert: n.v.t.
- Datum verzoek: n.v.t.
- Strekking van het verzoek: n.v.t.
- Datum expert advies: n.v.t.
- Advies expert: n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Geen enkel lid is uitgesloten van advisering vanwege betrokkenheid bij het onderzoek.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het gaat om een project rond fibrose, met een duidelijke strategie en opzet. De samenhang bestaat eruit dat in diverse organen een vergelijkbaar fibroseproces kan ontstaan, waardoor het zinvol heeft dit proces in die organen in samenhang te bestuderen. De verschillende studies kunnen informatie opleveren die van nut zijn bij de overige studies. De DEC heeft om uitleg gevraagd over het includeren van een subdoel. Naar aanleiding van het uitgebreide antwoord op deze vraag begrijpt de DEC dat ook dit doel een directe invulling is van het eerste subdoel van de aanvraag, namelijk validatie en verdere optimalisatie van de modellen. De DEC concludeert dat studies naar het fibroseproces en therapieën in dit project worden gecombineerd met studies naar het verbeteren van modellen en uitleesparameters. Voor de DEC is juist deze combinatie een sterk element in dit projectvoorstel, omdat daarmee het werken voor opdrachtgevers gecombineerd wordt met een sterke eigen inhoudelijke kennis en de daadwerkelijke mogelijkheid om modellen te verbeteren. Zie hiervoor ook element 7 van het advies met betrekking tot de proefopzet en haalbaarheid. De DEC heeft ook uitgebreid gesproken over het samenbrengen van 4 fibrosemodellen in een aanvraag. Daarbij is de conclusie van de DEC dat het juist essentieel is om deze fibrosemodellen niet te scheiden omdat a) in mensen ook verschillende organen aangetast kunnen zijn en b) dit vermindering in het gebruik van dieren kan faciliteren. Dit omdat de modellen niet elk op zichzelf staan, maar net als bij mensen meerdere uitingen van fibrose kunnen laten zien. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en). Er is sprake van translationeel/toegepast onderzoek, waarbij fibrose wordt bestudeerd in het dier in combinatie met de transleerbaarheid naar de mens. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het testen van nieuwe anti-fibrotische therapiemogelijkheden in diverse fibrosemodellen die zo goed mogelijk bijdragen aan het voorspellen van klinische effectiviteit. Het uiteindelijke doel van het project is de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen fibrose. De DEC TNO ziet deze samenhang duidelijk. Door het testen van therapieën, met daarbij extra aandacht voor de transleerbaarheid naar de mens, kan dit project bijdragen aan het daadwerkelijk ontwikkelen van goede medicijnen tegen fibrose. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: fibrosepatiënten en de muizen en ratten die als proefdier gebruikt worden. Daarnaast hebben opdrachtgevers belang bij informatie over hun product. Ook de uitvoerende organisatie en de medewerkers die aan het onderzoek werken hebben een belang. Voor de patiënten zijn in het geding de waarden: leven, gezondheid, welzijn, activiteiten kunnen ontplooiën. Voor de proefdieren zijn in het geding de waarden: leven, gezondheid, welzijn en natuurlijk gedrag kunnen vertonen. Voor de opdrachtgevers en de uitvoerende organisatie gaat het voornamelijk om een economisch belang. Voor de betrokken medewerkers van TNO gaat het om hun professionele ontwikkeling. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen. De dieren worden gehuisvest onder veilige condities en zullen geen gevaar opleveren voor het milieu. De vergunninghouder heeft geborgd dat potentieel milieubelastend afvalmateriaal op passende wijze wordt afgevoerd. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De aanvrager geeft aan bij 3.2 in het projectvoorstel dat de betrokken onderzoekers jarenlange ervaring hebben in het veld, inclusief een uitgebreid inhoudelijk netwerk waarbinnen wordt samengewerkt. In het antwoord op vraag 1 van de DEC aan de aanvrager komt bovendien een duidelijke focus naar voren die de haalbaarheid versterkt. Op grond van deze beschrijvingen ziet de DEC geen reden om te twijfelen aan de haalbaarheid zoals die is omschreven. Dit geldt ook voor de toepassing van de 3 V's, mede door het antwoord op de door de DEC gestelde vraag 3, naar

literatuuronderzoek inzake modellen. Hier geeft de aanvrager aan goed op de hoogte te zijn van actuele literatuur, maar ook met een kritische houding staat tegenover de publicaties in dit veld. De aanvrager beschrijft derhalve een netwerk van experts waar men een reëler beeld vindt van de transleerbaarheid van de resultaten in dit veld. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager beschrijft een uiteindelijk doel van de onderzoekslijn, maar specificereert ook concrete, haalbare doelen voor dit project: therapiemogelijkheden testen en daarbij modellen voor fibrose verbeteren wat betreft het voorspellen van klinische effectiviteit. De DEC neemt mee in haar weging dat een deel van het project ingegeven wordt door de mogelijkheid om het diermodel en daarmee de transleerbaarheid te verbeteren. Het antwoord getuigt van het feit dat deze verbeteringen daadwerkelijk haalbaar zijn en zelfs tot verbeteringen kunnen leiden in de internationale gemeenschap in handen van deze groep. De aanvrager stelt namelijk niet alleen modellen te verbeteren, maar de wegen te kennen om ook de acceptatie van dergelijke verbeteringen door de FDA te realiseren. Het antwoord van vraag 1 samen met vraag 3 geeft in de ogen van de DEC een unieke combinatie weer van een onderzoeksomgeving waar het probleem wordt aangepakt met een multidisciplinair team met expertise en netwerk op het gebied van fibrose in vitro, in vivo, translatie en wet- en regelgeving. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU-richtlijn. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het is ingeschat als voor het gros van de dieren maximaal matig en voor een klein percentage ernstig (0,5%). De DEC is van mening dat deze percentages realistisch zijn

ingeschat. De DEC heeft gediscussieerd over de vraag of extra monitoring dit percentage zou kunnen verlagen. In het antwoord op vraag 6 van de DEC maakt de aanvrager duidelijk dat de monitoring passend is ingeregeld om het percentage dieren dat ernstig ongerief ondergaat zeer laag te houden. Daarnaast maakt de aanvrager in het antwoord op vraag 2 van de DEC duidelijk dat er geen extra ongerief is inherent aan de foklijnen van transgene muizen. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

12. De integriteit van de dieren wordt aangetast in die zin dat ze als proefdier worden gebruikt en worden gedood. Er is geen andere aantasting van de integriteit van het dier. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlagen goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Het gaat om lage percentages en de criteria zijn duidelijk geformuleerd en door de DEC passend bevonden. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn voor het bestuderen fibrotische aandoeningen. Dit heeft te maken met de complexiteit van deze aandoeningen. De DEC ziet in dat met name het afweersysteem van een levend organisme op dit moment nog niet nagebootst kan worden. De DEC neemt mee in haar weging dat de vergunninghouder ook een onderzoeksprogramma heeft op het gebied van *in vitro*-modellen. Ook beschrijft de aanvrager in de strategie dat geschikte targets geïdentificeerd worden op basis van bijvoorbeeld literatuur, humane studies en/of *in vitro*-testen. Vervolgens wordt voor het valideren of modificatie van het target inderdaad tot verandering van pathologie kan leiden gebruik gemaakt van *in vitro* testen, *ex vivo* testen met humaan weefsel, naast het gebruik van *in vivo* testen in transgene dieren. Daarmee is het voor de DEC helder dat het gebruik van dieren het moment is dat er geen alternatieven zijn zonder dieren. De DEC vertrouwt erop dat de IvD hierop op experimentniveau zal toezien. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat op grond van literatuur en statistiek. Er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Deze strategie bestaat uit het raadplegen van erkende statistische berekeningsmethoden en het combineren van meerdere modellen in dieren. In de bijlagen 1 en 2 laat de aanvrager zien alert te zijn op mogelijkheden voor vermindering. Bijlage 1: in het verleden zijn uitleesparameters verminderd, waardoor de groepsgrootte verkleind kon worden. Bijlage 2: door een andere anesthesiemethode kon de uitval worden verminderd (waardoor minder dieren nodig zijn voor betrouwbare uitkomsten). In het antwoord op vraag 9 van de DEC bevestigt de aanvrager dat men op de hoogte is van de gevolgen van het stellen van eisen aan de power van het experiment, namelijk het gebruik van meer dieren. Maar de DEC is ervan overtuigd dat het

gebruik van meer dieren dan ook een sterker resultaat zal genereren, wat extra dierproeven daarna zal kunnen voorkomen. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd, en dat de dierproeven met zo min mogelijk stress en ongerief gepaard gaan. Zo worden er modellen gekozen waarin fibrotische aandoeningen zich relatief snel manifesteren op moleculair-biologisch niveau en krijgen herstellende dieren een warmtematje (bijlage 2). Dit zijn enkele voorbeelden waaruit wij opmaken dat er aantoonbaar aandacht voor verfijning is. Met het antwoord op vraag 6 van de DEC is bovendien duidelijk geworden hoe monitoring van het ongeriefniveau plaatsvindt. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. In de bijlagen staat beschreven hoe soms mannelijke en soms vrouwelijke dieren zullen worden gebruikt, in overleg met de opdrachtgever. De strategie en onderbouwing hierbij vindt de DEC overtuigend. De DEC is er dan ook van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven variërend met mannelijke, dan wel vrouwelijke dieren uit te voeren. Zo wordt in bijlage 1 gekozen voor mannelijke muizen omdat zij sneller longfibrose ontwikkelen dan vrouwtjes. Bij ratten is het vrouwelijke model gevalideerd, maar is na eventuele validatie van het mannelijke model gebruik van dat model een mogelijkheid. In de beschikking heeft de CCD de voorwaarde gesteld dat mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen worden gebruikt, met als doel het fokoverschot te beperken. Nu is gebleken dat tot nu toe ongeveer 75% van de gebruikte dieren man is, en ongeveer 25% vrouw (van de bijna 410 dieren gebruikt in studies) en dat er wetenschappelijke redenen zijn om dit onevenredige gebruik voor de verdere duur van de looptijd voort te zetten. Dit wordt uitgebreid toegelicht in een begeleidende brief en bijgevoegde referenties. De DEC vindt deze argumentatie overtuigend.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat het noodzakelijk is voor de te behalen doelen om weefsels van de dode dieren te bestuderen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU-richtlijn, passende methode gedood. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.
20. Omdat in het projectvoorstel specifieke typen muizen en ratten worden aangevraagd, is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en is begrijpelijk geformuleerd. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven. In de NTS is bij 3.4 een toevoeging

gedaan die los staat van het evenredige gebruik van de geslachten: "(in zeer uitzonderlijke gevallen zal dit oplopen tot ernstig ongerief)." Deze toevoeging lijkt ingegeven door een realistischer beeld dat inmiddels is ontstaan en verandert niet de inschatting van de ongeriefcategorie, zolang het inderdaad om zeer uitzonderlijke gevallen gaat. Daarom vindt de DEC deze toevoeging acceptabel.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in processen en therapieën bij fibrose-aandoeningen de dood van maximaal 24.000 muizen en maximaal 4.000 ratten, en daarbij voor 10% van de dieren licht ongerief, 89,5% matig ongerief en 0,5% ernstig ongerief? Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.
2. De DEC TNO is van mening dat het maatschappelijk belang van inzicht in processen en therapieën bij fibrose-aandoeningen in dit project zwaarder weegt dan het belang van de proefdieren om niet aan de proeven te worden onderworpen, met bijkomend ongerief. Indien de doelstellingen bereikt worden, wat aannemelijk is, is dat een stap vooruit in de ontwikkeling van betere therapieën ter voorkoming of genezing van fibrose-aandoeningen. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.
3. De DEC is overtuigd van het belang van het doel, namelijk het verkrijgen van inzicht in fibroseprocessen ten behoeve van de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen fibrose. Door de transleerbaarheid van de mens kan dit project bijdragen aan de ontwikkeling van dergelijke medicijnen. De waarden die voor patiënten in het geding zijn wegen zwaarder dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. De voorgestelde experimentele opzet, in combinatie met de deskundigheid van de uitvoerenden, kan daadwerkelijk bijdragen aan belangrijke gezondheidsdoelen voor menselijke patiënten. Ook heeft de DEC op grond van het projectvoorstel er vertrouwen in dat de aanvrager kan voldoen aan de 3V-voorwaarden. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning voor de wijziging te verlenen.
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies, behalve de vragen zoals die gesteld zijn aan de aanvrager. Deze zijn door de aanvrager naar tevredenheid beantwoord. Dit is voor de wijziging gelijk gebleven.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast
Natuurwetenschappelijk Onderzoek)

10.2.e.eng

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD5010020172207-4

Bijlagen

3

Datum 8 januari 2021

Betreft Beslissing Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e.eng,

Op 19 november 2020 hebben wij uw aanvraag voor een wijziging op een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." met aanvraagnummer AVD5010020172207-4. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw wijzigingsaanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het vanaf de datum van deze brief is toegestaan om de aangevraagde projectwijziging uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning is afgegeven voor de periode van 1 november 2017 tot en met 31 oktober 2022.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

Procedure

Datum:

8 januari 2021

Aanvraagnummer:

AVD5010020172207-4

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie **10.2 .e. en g** DEC (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 3 december 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk april 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 93118, 2509 AC Den Haag.

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

8 januari 2021

Aanvraagnummer:

AVD5010020172207-4

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

A black rectangular box containing the text "10.2 .e. en g" in a light gray, sans-serif font, likely representing a redacted signature or stamp.

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek)

Adres: Postbus 96800

Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG

Deelnemersnummer: 50100

deze wijziging in de projectvergunning voor het tijdvak 1 november 2017 tot en met 31 oktober 2022, voor het project "Het bepalen en valideren van de effectiviteit van nieuwe geneesmiddelen en het onderzoeken van de mechanismen die betrokken zijn in het ontstekings- en fibrose proces m.b.v. in vivo fibrose modellen." met aanvraagnummer AVD5010020172207-4, na advies van dierexperimentencommissie De nieuwe DEC. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is Research assistant verantwoordelijk. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 19 november 2020
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 3 december 2020;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Longfibrose in muis of rat, zoals ontvangen op 3 december 2020;
 - 3.4.4.2 Nierfibrose in muis of rat, zoals ontvangen op 3 december 2020;
 - 3.4.4.3 Huidfibrose in muis of rat, zoals ontvangen op 3 december 2020;
 - 3.4.4.4 Leverfibrose in muis of rat, zoals ontvangen op 15 juni 2017;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 3 december 2020;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 3 december 2020.

Aanvraagnummer: AVD5010020172207-4

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Longfibrose in muis of rat			
	Muizen (Mus musculus)	6.000	1,0% Ernstig 99,0% Matig
	Ratten (Rattus norvegicus)	1.000	1,0% Ernstig 99,0% Matig
3.4.4.2 Nierfibrose in muis of rat			
	Muizen (Mus musculus)	3.000	1,0% Ernstig 99,0% Matig
	Ratten (Rattus norvegicus)	800	1,0% Ernstig 99,0% Matig
3.4.4.3 Huidfibrose in muis of rat			
	Muizen (Mus musculus)	6.000	1,0% Ernstig 99,0% Matig
	Ratten (Rattus norvegicus)	1.000	1,0% Ernstig 99,0% Matig
3.4.4.4 Leverfibrose in muis of rat			
	Muizen (Mus musculus)	6.000	1,0% Ernstig 99,0% Matig
	Ratten (Rattus norvegicus)	1.000	1,0% Ernstig 99,0% Matig

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk april 2024 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

Aanvraagnummer: AVD5010020172207-4

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid 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:
AVD5010020172207-4

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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 onvereenigbaar 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

Aanvraagnummer:

AVD5010020172207-4

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b van de wet 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 13c van de wet 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 13d van de wet 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, eerste lid onder d en derde lid 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.



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for 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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- 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.

The immune response is the most important defense system in the host to fight against pathogens. The immune response naturally consists out of two types of responses, the so-called innate and adaptive immune response. The innate immune response is very fast but relative unspecific whereas the adaptive response takes much longer but is more specific and immune-memory is able to develop.

The starting point for activation of the immune response is recognition of the pathogen. A large family of pattern-recognition receptors (PRRs) are able to recognize specific patterns (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) either on the in-or outside of pathogens. After recognition of the pathogen by PRRs intracellular signalling pathways are activated and the immune response is further guided by the production of cytokines and chemokines.

In the last couple of years a lot of studies have been performed to unravel the specific immune responses induced by either bacterial or fungal pathogens (overview of the international articles in reviews in 1-3). These studies point out that many members of the PRR family play an important role in the recognition and induction of the immune response by either *Borrelia*, *Candida*, or *Aspergillus*. For example, the role of many members of the Toll-like receptor family including TLR2, TLR4, and TLR10 were demonstrated to be important in the pathogenesis of Lyme disease, Candidiasis, or Aspergillosis (1-3). Next to Toll-like receptors, it could also be demonstrated that other PRR-family members are very important in this process, such as NOD1 and NOD2, or CLR's such as Dectin-1 or DC-SIGN. Next to that, it could even be demonstrated that patients having certain genetic variants in one of the PRRs suffer much more from either bacterial or fungal infections and that modulation of the immune response in these patients helped significantly (4). By assessing the specific recognition of bacterial and fungal pathogens, the first step is taken into the broader understanding of this complex process. To get more insight into the precise mechanism of bacterial and fungal recognition will eventually lead to better treatment options and new study targets for designing new treatment strategies using immunotherapy. Very recently we detected two immune members, TLR10 and IL-37, both involved in inhibiting immune responses against *Borrelia*, *Candida*, *Aspergillus* and other pathogens that are able to inhibit the immune response. These findings may be of high importance and therefore we want to start our research with these candidates. At this moment, we know that these members inhibit the immune responses, however, we do not know HOW they do this.

Most studies demonstrating roles of pattern recognition receptors in either *Borrelia*, *Candida*, or *Aspergillus* infection only demonstrate candidates using for example genetic data, in vitro data, or lack sufficient in vivo data to support their hypothesis. By combining this knowledge from the literature with ex vivo and in vivo experiments as proposed in this project, we are able to strengthen the existing data but also provide evidence for the involvement of the PRRs proposed in in vivo infection models using *Borrelia*, *Candida* and/or *Aspergillus*. Examples of earlier projects such as this proposal by our group can be found in (5-7). The different PRRs (such as TLRs) described in literature share intracellular signaling pathways and proteins. These signaling pathways may also be affected in patients suffering from disease. In this project, we want to detect these differences in infection models and assessing the importance of these proteins in the pathogenesis. If these proteins play an important role in for example the cytokine production by immune cells or the process of causing tissue damage, we also want to study the effect on disease severity after modulation of these proteins in infection models.

To detect and select the proteins/targets that we want to study in these animal models of disease, we take the following steps. In the last years we have built a cohort of around 200 healthy human volunteers and another cohort consisting out of 500 healthy volunteers whereby immune cells were stimulated with several pathogens/PRR ligands and cytokine responses were measured at several timepoints. Next to that, transcriptome data, genetic data, microbiome measurements and metabolome data are assessed (<http://www.10.2.e.eng.org/>). Using bioinformatics approaches new targets are detected demonstrating an effect by the response against a certain pathogen. An example of this was the inhibitor against HIF-1alpha being involved in *Borrelia*-induced IL-22 production (8). When a target in these studies is detected, in vitro validation experiments are performed in our laboratory using cell lines, primary human immune cell stimulation, or for example experiments using bone marrow derived cells from earlier mouse experiments. When after these sets of experiments the selected targets is still capable of demonstrating differences in the immune response against the specific pathogen we want to make the step towards animal experiments to assess the role of the target in disease pathogenesis.

For *Borrelia*, we are the only research group in the world that studies the pattern recognition receptors involved at the recognition combining this with genetic data, cytokine responses and the role in the pathogenesis caused by these pathogens. This approach is unique in the world but provides a broader view on the results found and can be easily implemented in our studies regarding *Candida* or *Aspergillus*. We are the only group in the world that is able to detect new targets that may influence

immune responses against *Borrelia*, *Candida*, or *Aspergillus* but supporting in vivo data is missing. To combine these three pathogens in one study makes the resulting data even stronger. We are able to detect differences in outcomes between the immune responses but next to that we can also easily detect pathogen-specific targets to modulate the disease outcomes. The most ideal situation would be that a target is detected specifically reacting on for example *Borrelia*-mediated immune responses that is able being modulated (in phase 3 of this project) whereby the disease severity can be inhibited but that this target is not reacting on the other pathogens studied.

Lyme disease, caused by the bacterium *Borrelia burgdorferi sensu lato*, is a growing health problem in the Netherlands. Over 22.000 newly diagnosed Lyme patients per year are currently reported, but this number is underestimated by missed cases. When patients suffer from persistent Lyme disease, due to treatment failure, they cannot fully contribute to the economy. The incidence is increasing and the current treatment strategies are very expensive for the Healthcare in the Netherlands. Novel treatment modalities or a reduction in the clinical signs by modulation of the immune response may be applicable for the treatment of other inflammatory diseases and will be cost-efficient for the society. Next to that, understanding of the pathogenesis of *Borrelia* is also important from a fundamental point of view and crucial for the development of new therapies. Other inflammatory diseases may also benefit from this knowledge, since many of these diseases are mediated through the same PRRs including fungal infections with either *Candida* or *Aspergillus*. The fungal pathogen *Candida albicans* is an important cause of sepsis in immunocompromised patients.

These patients suffer from mortality rates between 30-40%. In these cases recognition of *Candida* plays an important role in the protection of the host against this fungus. *Aspergillus fumigatus* is an opportunistic fungal pathogen that can cause invasive aspergillosis in immunocompromised hosts. These patients require immunosuppressive therapy making them highly susceptible to aspergillosis. In these patients, aspergillosis is associated with a high mortality with an overall 50% mortality rate.

Based on the findings described together with additional data external funding has been obtained to extend this research line (ZonMW VENI grant). In this project, the role of the Toll-like receptor family member (TLR10) next to other PRRs/signaling pathways such as TLR2, TLR4, NOD1, NOD2, and/or Dectin-1 or cytokine signaling pathways will be further explored. Next to that, [10.2.e.e.n.g](#) grant has been obtained to further extend this project the coming 5 years.

Knowledge about the immune recognition of these bacteria and fungi, next to the attraction of immune cells to the place of infection, the pathological effect of the bacteria and fungi, and the induction of the cytokine response in combined experimental settings are largely missing. Therefore, the main goal of this research proposal is to characterize the immune response induced by these pathogens and identify factors which can be modulated to have a significant effect on the pathogenesis in order to reduce the clinical signs / pathogenesis. We want to study new targets, such as TLR10 as earlier described, but also we want to assess the role of mediators in PRR-signaling pathways such as p38, JNK, or NFkB. Before we initiate an animal experiment in vitro experiments using either mouse or human cells will be performed. If the results of the in vitro experiments show definite and promising results, then we will initiate the mouse experiments. At this moment it is hard to state which targets will be studied since not all signalling pathways are known. We will study targets involved in the TLR-signaling pathways but also targets in cytokine production pathways or other pathways involved in the immune response against either *Borrelia*, *Candida*, or *Aspergillus*.

Results coming from this proposal will lead to future study targets to improve faster diagnosis of these bacterial and fungal infections. When the exact route of recognition of these pathogens by the host is known, modulators could be provided to patients with early infection which shortens the infection time and improves the chance of recovery in these patients. On the other hand, results from this project will also provide more insight into infections caused by other pathogens since the pathogen recognition systems partially overlap. Other research groups can use the data found and implement this in their own research lines.

Very importantly, our current understanding of the immunobiology of infections has been defined in laboratory mice strains due to the experimental advantages they offer, such as inbred homogeneity, tools for genetic manipulation, the ability to perform kinetic tissue analyses starting with the onset of disease, and tractable models. Despite revealing many fundamental principles of immunology, there is

growing concern that mice fail to capture relevant aspects of the human immune system, which may account for failures to translate disease treatments from bench to bedside. Laboratory mice live in abnormally hygienic "specific pathogen free" (SPF) barrier facilities. For all these reasons, we also intend to perform experiments in mice that were bred in conditions closer to those found in nature (wild-like mice), such as those found in pet shops. These wild-like mice have been bred under all the rules of housing and care and established by the law, so their welfare and health status is guaranteed. However, they present a more varied genetic background and a much richer microbiota, so they represent an excellent tool to study the effects of infections in an animal human more representative of the human situation, increasing the reproducibility, translatability and robustness of the results of the experimentation with the animals.

Since the genetic backgrounds of the wild-type mice and wild-like mice are different, we will also have littermates of the wild-type mice: half of them will be kept in their original pathogen free conditions, while the other half would be exposed to the wild-like mice conditions by keeping these wild-type and wild-like mice in the same room and with bedding of the wild-like mice put in the cages of the wild-type mice.

Initially, we will look at the role of specific PRRs and signaling molecules in bacterial and fungal infection using knockout animals, wild-like animals and wild-type animals. These targets will be assessed using in vitro experiments. Thereafter, infection models will be adapted to look into the role of these targets in an in vivo situation. The in vivo behavior of these targets can only be assessed in animal models. Knowledge obtained in these ex vivo and in vivo experiments will be used to select targets for modulation of the immune response against these pathogens and will be used in in vivo experiments.

Inflammation will be initiated, followed by modulation of the selected targets and clinical signs and cytokine production will be assessed. To do this, specific compounds or antibodies influencing the targets will be applied on the animals before or during the infection. Thereafter, the effect on the inflammation will be assessed. This knowledge is of great importance to apply on patients suffering from either Lyme disease, Candidiasis, or Aspergillosis. The most ideal outcome of this study would be that we are able to select a target that is capable of dampening the inflammation and thereby reducing the suffering for the patient and reducing the duration of the illness.

1. 10.2 .e. en g [REDACTED]
2. 10.2 .e. en g [REDACTED]
3. 10.2 .e. en g [REDACTED]
4. 10.2 .e. en g [REDACTED]
5. 10.2 .e. en g [REDACTED]
6. 10.2 .e. en g [REDACTED]
7. 10.2 .e. en g [REDACTED]
8. 10.2 .e. en g [REDACTED]

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?

The purpose of this research is to characterize the immune response in bacterial, fungal, and inflammatory diseases and to identify factors that can modulate the immune response.

Therefore, the aims in this project are:

1. Which components of PRR-signaling pathways (such as TLRs, CLRs, NLRs and cytokine signaling) are crucial in the immune response against *Borrelia* bacteria, *Candida* spp, or *Aspergillus* spp?
2. Are we able to modulate this immune response and thereby influencing disease severity by targeting specific components in the signaling pathways induced by these pathogens?

Experiments described in this project will answer the question which components of the immune system overlap between the different type of infections and which of the components are pathogen-specific. The main focus of our department are infection and inflammation. This includes zoonoses like borreliosis, but also commensal (*Candida albicans*) and pathogenic species (*Aspergillus fumigatus*). *Borrelia*, *Candida*, and *Aspergillus* are studied in our department for more than 10 years and these species are immunologically very interesting since the responses between these targets partly overlap, but also have their own specific footprint. Next to that we discovered several genetic variants in immunological related proteins that can influence disease susceptibility in all three types of infectious diseases. As also described in 3.1 background, we are able to assess the role of different targets by making use of the two large cohorts consisting out of 10.2.e.eng. By combining cytokine profiles, genetic data, transcriptome analysis and metabolome measurements we are able to make a very strong analysis for a target for either *Borrelia*, *Aspergillus*, or *Candida* since these pathogens were also included in the cell stimulations in these cohorts. For these reasons we chose to study *Borrelia*, *Candida* and *Aspergillus*. The information which will be obtained during these studies may also be applicable on other pathogens but this is beyond the scope of the proposed research.

Aim 2 will answer the question whether we are able with usage of the new targets to detect, predict, enhance and/or inhibit the inflammatory response against these pathogens. This type of research has proven as being very valuable for subsequent clinical translation of new therapeutic agents.

In the past decades, we have obtained broad experience using this strategy of characterizing specific components in the immune response. Our research is published in international peer-reviewed journals, and ample external funding has been obtained to conduct this research (e.g. ZonMW, Dutch Arthritis Foundation, ERC, 10.2.e.eng).

3.3 Relevance

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

In the experiments described in this project we will study host-microbe interaction, the induction of the inflammatory response and we will try to modulate these responses against bacteria and fungi. The study targets found in (earlier) in vitro experiments such as the well-defined cohorts with healthy volunteers and subsequent validation experiments (such as described in 3.1) will be assessed in infection models which will further increase our knowledge about the immune responses against these pathogens. This knowledge can be applied in personalised treatment options, the therapeutic effect will be enhanced and the unwanted side effects of treatment can be diminished. Finally, this will lead to improved treatment outcomes for the patients and also new study targets for developing new treatment strategies for other pathogens.

3.4 Research strategy

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

To reach the goals as described in 3.2 purpose, the experiments can be subdivided into three stages. Only stages 2 and 3 include animal experiments, but for an overview of the research strategy strategy all three stages are briefly described below:

In the first stage, the role of important pattern recognition receptors and cytokines in humans will be

characterized in in vitro experiments, to determine their role in the recognition of the different pathogens. In this phase we do not need animals, we will make use of cell lines and primary human immune cells. Hereby we will make use of individuals carrying different single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the PRRs and cytokines affecting the recognition capacity of the PRR/immune system component studied. Next to that, we will use (already available) RNA sequencing data to select study targets. We have built already several large cohorts with healthy individuals but we are also working on the assembly of large patient cohorts. At this moment we have the availability of two large cohorts that are immunologically well defined whereby cytokine production, genetic data, transcriptome data, metabolomic data and microbiome data are available (also described in 3.1 and on <http://www.10.2.e.eng.org/>). Next to that, we will expose the white blood cells of healthy individuals to modulators of the immune response and thereafter the cells will be exposed to either *Borrelia*, *Candida*, *Aspergillus*, or controls. As a read-out, cytokine production will be measured. To minimize the number of animal experiments that need to be performed, only targets that show potential and optimal in vitro characteristics will be selected to be tested in vivo. The approach that is often used is the following (in this example *Borrelia*); we detect for example high levels of cytokine X when immune cells are exposed in vitro to *Borrelia*. We see a large degree of variation in the levels of produced cytokine X and by using the cohort of 200 healthy volunteers we find (using bioinformatic analyses that combines the several types of data available) target Y that influences this *Borrelia*-dependent cytokine X production. This target Y could also be confirmed in the cohort of 500 healthy volunteers. Next to that, when we silence or stimulate factor Y in cells (either cell lines or isolated human cells) we are also able to demonstrate the role of target Y in the production of *Borrelia*-dependent cytokine X. In these situations, we will proceed to step 2 of this proposal which include animal experiments. In the second stage animals will be used for ex vivo stimulation experiments. Hereby we will use wild-type, wild-like and knockout animals which lack specific components in the immune response as found in the first stage of this research. Cells and organs will be isolated from naive animals and exposed in an ex vivo system to either *Borrelia*, *Candida*, *Aspergillus*, or controls to validate the findings from the first phase but also to test the targets in a model which guarantees complete absence of the target in the used cells. We will determine cytokine production by either ELISA, PCR or other techniques, but also cell viability, cell metabolism, and gene regulation. When the results from these experiments confirm the findings found in stage 1, we will decide to continue and to study the role of this target in phase 3 of the proposal in disease models.

In the final stage the targets found in phase 1 which could be confirmed in phase 2 will be tested in in vivo models. In this phase, two types of experiments are proposed; 1) Wild-type and knockout animals or wild-like animals will be infected with either *Borrelia*, *Candida*, or *Aspergillus* spp and at several different timepoints imaging will be performed followed by sacrificing the mice and cells and organs will be collected. In the *Candida* and *Aspergillus* infection models also survival experiments will be performed. These survival experiments are necessary to study the role of the targets in the pathogenesis of the disease, to study tissue damage, and the immune response over time. 2) In the second set of experiments, wild-type and knockout mice or wild-like animals will be pre-treated with components as found in phase 1 and phase 2 and thereafter these mice will be infected with either *Borrelia*, *Candida*, or *Aspergillus*. Monitoring of the immune response will be performed at different timepoints and thereafter the mice will be sacrificed and cells and organs will be collected to measure the immune response. Also in this set of experiments survival experiments with either *Candida* or *Aspergillus* infection will be performed. This is necessary to detect whether we are able to modulate the disease outcome and to monitor the duration of the effects.

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.

The targets found in the in vitro stage (phase 1) will be tested in phase 2 and phase 3 of the proposed research.

The majority of the animal experiments proposed will be carried out in mice lacking specific components of the immune system, as these are the lowest vertebrates in which the immune system functions as being most comparable to the human immune system.

In phase 2 the cells and organs isolated from either wild-type, knockout or wild-like mice can be used for the *Borrelia*, *Candida* as well as the *Aspergillus* experiments. In a typical experiment, mice are sacrificed

whereafter blood, cells, and organs are isolated. These components will be taken to the lab and used for ex vivo stimulation experiments. The responses from the knockout mice or wild-like mice will be compared to responses of wild-type mice.

In phase 3 of the research, mice will be infected with either *Borrelia*, *Candida*, or *Aspergillus* spp on different infection ways depending on the pathogen studied. In a typical experiment, first, the therapeutic agent or antibody against the target will be administered (either a single dose or multiple depending on the component) followed by infection with either *Borrelia*, *Candida*, or *Aspergillus* and the therapeutic effect on disease outcome will be assessed. Disease outcome will be assessed by measuring pathogen load, phenotypic changes in the mice (as assessed by disease scoring systems), body weight and temperature, swelling of for example joints (in *Borrelia*-infected mice), and specific inflammatory markers in blood and cell samples using for example cell imaging or cell stimulation systems.

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.

After the in vitro characterization of the targets in the immune response, the animal studies involve:

- 1) Phase 2; Ex vivo assessment of
 - a) cytokine production capacity
 - b) phagocytosis/killing capacity of cells
 - c) changes in metabolic parameters
 - d) changes in gene regulation
- 2) Phase 3; Determination of the role of these targets in in vivo infection models

After each phase we will evaluate which of the targets will play an important role in the immune response. Thereby we will also make a selection in the targets that will have value in either *Borrelia*, *Candida* or *Aspergillus* spp infection to reduce the amount of animal experiments and to study pathogen-specific components. If the target selected in phase 1 shows unfavorable effects in phase 2 we will not continue to phase 3. Next to that, if a target in phase 2 only gives a response to for example *Borrelia* we will only study *Borrelia*-infection for this target in phase 3.

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	<i>Borrelia</i> infection models
2	<i>Candida</i> infection models
3	<i>Aspergillus</i> infection models
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1030020184825-2 / 2016-0100
2. Titel van het project: Host-microbe interactions; bacterial versus fungal infections.
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar de afweerrespons bij infectieziekten

4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer AVD1030020184825

5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: 024-361 90 75, bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: dierexperimentencommissie@radboudumc.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 06-06-2019
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 11-06-2019
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 17-06-2019 tot 02-07-2019
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag:
 - advies aan CCD: 16-07-2019

7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.

8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 17-06-2019
 - Datum antwoorden: 02-07-2019
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Algemeen:

- Het totaal aantal dieren blijft gelijk. Welke experimenten zullen niet gedaan worden en waarom zijn die niet meer noodzakelijk voor het behalen van de doelstelling van het project?
Antwoord: This line of experimentation is a priority for our laboratory. We will give preference to the mice assigned in the license to perform this series of experiments, focusing on this line of research. We will postpone experiments to be performed in knock out mice in order to focus on the differences between wild-type and wild-like mice. Our intention is to conduct a series of pilot experiments to evaluate the size of the differences between the groups and have a clear idea of the validity of the hypothesis. If these pilots show interesting results, we will consider applying for a specific license for this project in order to expend the lines of research linked to it and the effects studied.

- Is de eerder berekende groeps grootte voldoende om effecten in deze wild-like dieren te meten? Dit zijn geen inbred-stammen, waardoor de variatie in te meten parameters veel groter zal zijn.

Antwoord: Indeed, the variability in wild-like mice is expected to be higher than in wild-type mice. However, one of the aims of these experiments is to have a degree of genetic heterogeneity and variability of responses closer to the human one, in order to improve the translatability of the results into humans. Anyway, we consider that the number of mice approved in the current license is big enough to increase the group sizes and obtain reliable results in the experiments.

- De antwoorden hebben niet geleid tot aanpassing van het wijzigingsverzoek.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een wijziging van vergunning met nummer AVD1030020184825. Aanvullend advies van de DEC over de wijziging is, gemarkeerd met *italics*, ingevoegd in de tekst van het oorspronkelijke advies hieronder.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze basaal-wetenschappelijke aanvraag richt zich op het onderzoeken van de immuunrespons tegen *Borrelia*, *Candida* en *Aspergillus*, waarbij de focus ligt op PRR (pattern recognition receptors)-signaleringsroutes. Bekend is dat veel leden van de PRR familie betrokken zijn bij het proces van herkenning en het opwekken van de immuunrespons door *Borrelia*, *Candida* en *Aspergillus*. Gezocht wordt naar de betrokkenheid van specifieke componenten uit een signaleringsroute welke cruciaal zijn voor de immuunrespons en die als zodanig beloftevolle 'targets' vormen om de immuunrespons te modificeren. Identificatie van geschikte targets vindt in eerste instantie plaats in *in vitro* experimenten met cellijnen en primaire humane immuuncellen. In de tweede fase wordt bevestiging gezocht met behulp van *ex vivo* stimulerings experimenten met materiaal verkregen uit knock out dieren welke specifieke componenten uit het immuunsysteem missen. In de laatste fase volgen experimenten met dieren, waarin getracht wordt de immuunrespons tegen deze pathogenen te veranderen zodat de ziektelast voor het dier afneemt. De commissie constateert dat deze aanvraag een concrete, goed afgebakende doelstelling heeft en getypeerd kan worden als een project. De opzet komt het beste overeen met voorbeeld 4b uit de handreiking 'Wat is een project'. De verschillende subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. De drie onderzoekslijnen (immuunrespons tegen *Borrelia*, tegen *Candida*, en tegen *Aspergillus*) worden parallel uitgevoerd. De experimentele aanpak in deze onderzoekslijnen is echter geheel identiek, en ervaring die wordt opgedaan in één van de onderzoekslijnen is mogelijk bruikbaar voor de andere onderzoekslijnen. De commissie is daarom van mening dat het niet in de rede ligt om voor elke onderzoekslijn een aparte vergunning aan te vragen (waarbij van een hoge mate van duplicatie sprake zou zijn). Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan.

Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. *De voorgestelde wijziging betreft het toevoegen van (reeds beschreven) experimenten met zogenaamde 'wild-like' muizen. Deze dieren van niet-gecertificeerde fokkers hebben een uitgebreidere of meer gevarieerde microflora dan de SPF-laboratorium muizen. Er zijn aanwijzingen dat het immuunsysteem van wild-like muizen meer overeenkomsten vertoont met de werking van het humane immuunsysteem. De aanvragers willen daarom onderzoeken of de infectie-experimenten dezelfde resultaten geven wanneer wild-like muizen worden geïnfecteerd en of contact met de micro-flora van wild-like muizen leidt tot andere resultaten in infectie-experimenten met wild-type laboratorium-muizen. Wanneer deze pilotexperimenten succesvol zijn, dan wordt een nieuwe vergunningaanvraag ingediend voor uitgebreidere experimenten met 'wild-like' dieren.*

2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het karakteriseren van de immuunrespons die optreedt bij besmetting met *Borrelia*, *Candida* en *Aspergillus*, en het identificeren van specifieke factoren die deze immuunrespons kunnen moduleren en zo de ziektelast kunnen verminderen. Het uiteindelijke doel is om met de verkregen kennis nieuwe, op de persoon toegesneden behandelingen voor bovengenoemde ziekten te ontwikkelen. De onderzoekers zullen *in vitro* en *ex vivo* identificeren welke PRR (pattern recognition receptors) betrokken zijn bij de immuunrespons tegen *Borrelia*, *Candida* en *Aspergillus*, waarna de betrokkenheid van specifieke componenten uit deze signaleringsroutes uiteindelijk *in vivo* wordt bevestigd in infectie-experimenten. Met deze kennis kan op termijn een therapie ontwikkeld worden die is toegesneden op de patiënt. De ontwikkeling van dergelijke therapieën is geen onderdeel van deze aanvraag, de focus ligt op het verkrijgen van basale kennis over de immuunrespons tegen verschillende infectieuze ziekteverwekkers. Er is daarom binnen deze aanvraag geen directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van de betrokkenheid van PRR bij de afweer tegen bacteriën en schimmels nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen, en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke

inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor patiënten en de samenleving is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan leiden tot de ontwikkeling van betere diagnostiek en/of nieuwe behandelingen voor ziekten. Meer kennis over de immuunrespons tegen bacteriën en schimmels kan op termijn leiden tot effectievere behandeling met minder bijwerkingen tegen deze infectieziekten, hetgeen van groot belang is voor de samenleving. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De onderzoekers zullen de regels voor het werken met pathogene bacteriën en schimmels in acht nemen, waardoor er geen onbedoelde effecten op het milieu te verwachten zijn. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvrager heeft veel ervaring met onderzoek naar specifieke componenten van de immuunrespons en met het werken met de drie te onderzoeken pathogenen. Het onderzoek heeft geleid tot tal van publicaties in vooraanstaande wetenschappelijke tijdschriften, en de onderzoeksgroep heeft veelvuldig externe subsidies (waaronder de 10.2.e. en g) ontvangen voor het onderzoek. De commissie is dan ook overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde, onder andere op grond van een artikel 9 kwalificatie, om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. De onderzoekers hebben omschreven op basis waarvan zij tijdens de looptijd van het project targets zullen selecteren die in de dierproeven getest zullen worden. De commissie is akkoord met de beschreven aanpak. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)

- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)

*De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: Laboratorium muizen leven in abnormaal hygiënische SPF barrière faciliteiten. Er is een groeiende bezorgdheid dat deze muizen bepaalde relevante aspecten van het humane immuunsysteem missen, die mogelijk verklaren waarom het vertalen van behandelingen van laboratorium naar de kliniek niet lukt. Wij zijn van plan om experimenten te doen met muizen die gefokt zijn onder natuurlijker condities (wild-like muizen), zoals bijvoorbeeld de muizen die in dierenwinkels worden verkocht. Hiervoor is het noodzakelijk om dieren te verkrijgen van een niet-gecertificeerde fokker. De DEC is van oordeel dat de aanvrager goede argumenten heeft om zogenaamde wild-like muizen te willen gebruiken. Met name voor de vraagstelling van dit project, het onderzoeken van de immuunrespons tegen *Borrelia*, *Candida* en *Aspergillus*, waarbij de focus ligt op PRR (pattern recognition receptors)-signaleringsroutes, kan het type muis dat gebruikt wordt van belang zijn. Deze muizen zijn op dit moment niet op een andere manier te verkrijgen.*

10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de (gevolgen van de) infectie met *Borrelia*, *Candida* of *Aspergillus*. De infectie met *Borrelia* geeft maximaal matig ongerief, afhankelijk van het gehanteerde model. De infectie met *Candida* of *Aspergillus* geeft maximaal ernstig ongerief voor 5% van de dieren. Voor 19% van de dieren zal het ongerief matig zijn, het ongerief voor de overige dieren is licht. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven, en door de infectie met micro-organismen waardoor het dier ziek wordt. Het dier wordt hierdoor gehinderd in zijn normale gedrag en de zelfredzaamheid neemt af. Er zullen in dit project ook genetisch gemodificeerde dieren gebruikt worden, maar deze modificatie leidt naar verwachting niet tot afwijkend gedrag of uiterlijk. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met deze ziektemodellen ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De immunoreactie tegen bacteriën en schimmels kan alleen goed in dieren onderzocht worden, omdat meerdere organen, weefsels en cellen een rol spelen in een immunoreactie. Het immuunsysteem van muizen lijkt voldoende op het immuunsysteem van mensen, waardoor de resultaten vertaald kunnen worden naar de humane situatie. Dit basale onderzoek kan om ethische redenen niet bij mensen plaatsvinden. De eerste identificatie van de targets zal *in vitro* worden gedaan. Voor het uitvoeren van de volgende fasen uit de onderzoekstrategie zijn dierproeven noodzakelijk. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. Het materiaal van de naïeve muizen wordt gebruikt voor het *in vitro* testen van de immunerespons tegen alle drie de ziekteverwekkers, waardoor er in totaal minder dieren nodig zijn. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed. De onderzoekers zullen een aantal experimenten met knock-out muizen uitstellen om deze pilotexperimenten met 'wild-like' muizen te kunnen uitvoeren. Wanneer de resultaten daartoe aanleiding geven zal een nieuwe vergunning worden gevraagd voor uitgebreidere experimenten met 'wild-like' muizen. Waarschijnlijk zijn voor de experimenten met 'wild-like' muizen grotere groepen nodig om wetenschappelijk betrouwbare uitspraken te kunnen doen, aangezien het geen inbred stam betreft en de variatie in te meten parameters veel groter zal zijn. Wanneer daar een betere vertaalbaarheid naar de humane situatie tegenover staat, is de DEC van mening dat het gebruik van grotere groepen dieren, en daardoor grotere aantallen dieren, gerechtvaardigd is. Het eerder gevraagde aantal dieren is toereikend om de groepsgrootte aan te kunnen passen.*
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De frequentie van het imageren van de dieren wordt aangepast aan de duur van het experiment. De aanvrager zal anesthesie toepassen voor de handelingen waarvoor dit is vereist. De experimenten die matig of ernstig ongerief voor de dieren opleveren (infectieproeven) worden alleen gedaan als daar goede wetenschappelijke redenen voor zijn. De commissie heeft met de onderzoeker van gedachten gewisseld over het toepassen van humane eindpunten in de survival experimenten. De onderzoekers zullen sterfte in de survival experimenten zoveel mogelijk voorkomen door het toepassen van humane eindpunten. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten kunnen ingezet worden. Binnen een experiment zullen dieren van één geslacht gebruikt worden teneinde variatie tussen experimentele groepen te minimaliseren waardoor het experiment met kleinere groepen uitgevoerd kan worden. De aanvrager heeft een voorkeur voor het gebruik van vrouwelijke dieren, om individuele huisvesting (noodzakelijk wanneer mannelijke dieren met elkaar vechten) te vermijden. Gezien het feit dat er in dit project sprake is van belastende, pijnlijke infectieproeven, meent de DEC dat het beperken van het aantal dieren in experiment vanuit ethisch gezichtspunt prioriteit verdient boven het beperken van het mogelijke fokoverschot van mannelijke dieren. De DEC is van mening dat de aanvrager weloverwogen beslissingen zal nemen in de keuze voor het gebruik van mannelijke en/of vrouwelijke dieren. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om bloed en verschillende organen te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen). *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. *De voorgestelde wijziging heeft niet geleid tot aanpassingen in de NTS. Het gebruiken van wild-like muizen wordt niet genoemd in de NTS. Wellicht verdient het toch nog aanbeveling om de aanvrager te verzoeken kort en in voor leken begrijpelijke termen uit te leggen wat het belang is van het gebruiken van dergelijke muizen die niet speciaal voor dierproeven zijn gefokt.*

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van het karakteriseren van de immuunrespons die optreedt bij ziekten veroorzaakt door *Borrelia*, *Candida* en *Aspergillus*, en het identificeren van factoren die deze immuunrespons kunnen moduleren, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan? *De voorgestelde wijziging heeft hierop geen invloed.*
2. Er vindt een lichte, matige of ernstige aantasting van het welzijn en een aantasting van de integriteit van de proefdieren plaats. De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken (beschreven in C9 tot C20).
Voor patiënten is dit onderzoek op termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. De ziekte van Lyme is een groeiend gezondheidsprobleem in Nederland. Wanneer de ziekte persisteert door een inadequade behandeling dan zijn patiënten veelal niet meer in staat om goed te functioneren in sociale netwerken en volledig bij te dragen aan de economie. Nieuwe behandelstrategieën of het moduleren van de immuunrespons zouden kunnen resulteren in een reductie van de klinische symptomen. Een infectie met *Candida* of *Aspergillus* verloopt ernstiger bij mensen met een verminderde afweer: dit kan leiden tot sepsis (door *Candida*, 30-40% mortaliteit) of invasieve aspergillose (mortaliteit 50%). Meer fundamentele kennis over de herkenning van deze ziekteverwekkers en de daaruit voortvloeiende immuunrespons kan op termijn bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor deze infectieziekten. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het beschikbaar komen van nieuwe therapieën voor infectie met *Borrelia*, *Candida* of *Aspergillus* van substantieel belang. Voor mensen met een verminderde afweer is dit van essentieel belang. *De voorgestelde wijziging betreft onderzoek met muizen die wat afweer betreft mogelijk beter aansluiten bij de humane situatie, waardoor de behaalde resultaten mogelijk nog beter vertaalbaar zijn naar mensen.*
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het karakteriseren van de immuunrespons die optreedt bij ziekten veroorzaakt door *Borrelia*, *Candida* en *Aspergillus*, en het identificeren van factoren die deze immuunrespons kunnen moduleren. Het uiteindelijke doel is om met de verkregen kennis nieuwe, op de persoon toegesneden behandelingen voor bovengenoemde ziekten te ontwikkelen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het

behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan. *De voorgestelde wijziging heeft geen invloed op de uitkomst van de ethische afweging.*

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- X Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IVD.
- o Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- o Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- o De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- o De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- o De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
t.a.v. Instantie voor dierenwelzijn
9101, t.a.v. CDL, route 231, HP 231
6500 HB Nijmegen

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020184825-2

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 16 augustus 2019

Betreft Beslissing Aanvraag wijziging projectvergunning dierproeven

Geachte Prof. Dr. van Krieken,

Op 4 juni 2019 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Host-microbe interactions; bacterial versus fungal infections" met aanvraagnummer AVD1030020184825, waarvoor op 19 maart 2018 een vergunning is afgegeven. Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD1030020184825-2. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u muizen toe te voegen aan uw vergunning die niet voor onderzoek gefokt zijn. De aantallen dieren en het ongerief verandert niet door deze wijziging. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Host-microbe interactions; bacterial versus fungal infections" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie RUDEC (hierna: de DEC). Dit advies is opgesteld op 16 juli 2019. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Wij nemen dit advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Nadere vragen aanvrager

Op 29 juli 2019 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op de verwachte aantallen muizen die niet voor onderzoek gefokt zijn en een aanpassing in de NTS. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum

16-08-2019

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1030020184825-2

Vergunning

Maximaal 920 muizen zijn niet gefokt voor onderzoek.

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.
U dient deze brief toe te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

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 93118, 2509 AC, 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 gegevens in het colofon.

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.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

10.2 .e. en g
Drs. F. Braunstahl

Bijlagen

- DEC-advies



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for 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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- 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.

Clinical relevance

Anorexia nervosa (AN) and obesity are disorders of energy balance that involve dysregulation of feeding by the brain. AN is one of the most common chronic illnesses in adolescence, where the lifetime

prevalence in 12-18 year old girls in Europe is 1-4%. Even though AN has dramatic individual, economic and societal impact, AN - compared to other diseases - is understudied, and there is an urgent need for improved treatment (Schmidt et al *Lancet Psychiatry*. 2016 Apr;3(4):313-5). Obesity represents a substantial global health challenge affecting >400 million people worldwide. Whatever the cause, obesity is the result of eating in excess of energy requirement and this is controlled by the brain. Diet-induced obesity triggers neurobiological adaptations that drive the intake of high-caloric foods (LaFleur *Int J Obes (Lond)*. 2007 Aug;31(8):1286-94). The genetics of obesity shows that the vast majority of associated genes acts in the brain. The aspect we address here is to understand why (people and) rodents exposed to diets with high palatability and many calories overeat. We address both what leads to the decision to eat too much (obesity) as too little (as in anorexia nervosa) as both decisions are processed in the brain in partially overlapping neural circuits. The long term aim of this proposal is to find novel treatments for eating disorders as AN and obesity. Emerging knowledge on gut-brain-signalling provides a unique opportunity to develop innovative therapies for obesity and AN patients.

Hypothesis: diet and microbiome affect food-related decision making via hormones

There is growing evidence that obesity and AN-induced starvation is associated with profound alterations of the microbiome (Herpertz-Dahlmann, et al *Eur. Child Ado-lesc. Psychiatry* 26, 1031-1041 (2017). Metabolites from microbiotes are sensed by enteroendocrine cells that release feeding-related hormones as cholecystokinin, glucagon-like peptide and ghrelin. There is also a relation between leptin sensitivity and the microbiome. (Alpha-)diversity of the microbiome was lower in rats that were insensitive to leptin, which suggests that alterations in the composition of the microbiome play a role in leptin sensitivity. We found that leptin sensitivity predicts development of obesity (10.2.e.eng [redacted]): rodents that do not reduce food intake the first hours after a leptin injection develop more severe obesity when exposed to a obesogenic diet (composed of sugarwater and lard on top of water and chow, known as the high-fat-high-sugar (HFHS) diet). Taken together, in AN and obesity there are changes in the microbiome that alter hormone signalling. These hormones act on neurocircuitry that controls food-related decision making and this impacts on the development of AN and obesity, as outlined below. There is also evidence for a role of inflammatory factors in mediating the effects of the microbiome on food-related decision making and energy balance. Therefore we will also measure changes in selected markers of inflammation (such as Il-6). We hypothesize that hormones like leptin, ghrelin and other gut-derived hormones mediate at least part of the effects of how diets and microbiome affects behaviour. In this project we address the gap in knowledge how changes in diet/microbiome and (feeding-related) hormones in anorexia and obesity affect the neurocircuitry that underlies food-related decision making and how this contributes to development of anorexia and obesity. Food-related decision making is influenced not only by energy balance, but also by appetitive (cues that are associated with food reward) and aversive stimuli (cues associated with negative consequences such as a mild electric foot shock) in the environment. An understanding of how gut signaling impacts on food-related decision making needs to take into account this kind of environmental stimuli.

Microbiome and brain disease

Two previous studies revealed a significant intestinal dysbiosis in AN, which was only partially alleviated with weight gain, e.g. lower abundances of Bacteroidetes and carbohydrate utilising taxa as well as higher abundances of Firmicutes and Verrucobacteria (Mack, I. et al. *Sci. Rep.* 6, 26752 (2016); Kleiman, S. C. et al. *Psychosom. Med.* 77, 969 (2015)). Mouse models intriguingly showed that the transfer of stool samples from obese to germ-free (GF) mice leads to obesity (Ridaura, V. K. et al. *Science* 341, 1241214 (2013). In contrast, the transfer of bacterial species from children with Kwashiorkor, protein energy malnutrition for instance caused by malaria, to GF mice produced significant weight loss (Smith, M. I. et al. *Science* 339, 548-554 (2013). Transferring stool from bariatric surgery patients to GF mice resulted in significantly less fat mass than colonization with the MI from obese controls (Tremaroli, V. et al. *Cell Metab.* 22, 228-238 (2015)). One study already showed that transfer of healthy stool to AN patients resulted in weight gain (De Clercq et al *Psychother Psychosom.* 2019 Jan 9:1-3). Thus, changes in the microbiome, induced by malnutrition, likely contribute to (the maintenance) of eating disorders, but via which mechanism this occurs is not known. There is emerging evidence in other psychiatric disorders, such as in ADHD (Aarts, E. et al. *PLoS One* 12, e0183509 (2017), that the microbiome plays a role in the altered activity of the dopamine (DA) system, e.g. increases in specific microbiome affected DA precursor synthesis and neural responses to reward anticipation. A distributed neuronal network (including the hypothalamus and dopamine (DA) neurons in the mesolimbic system) mediates effects of hormones like leptin and ghrelin on food-related decision making. Neuropsychological studies show that AN patients respond differently to reward and punishment

in comparison to healthy controls, and neuroimaging studies confirm a deficit in the response of the mesolimbic DA system to wins and losses (DeGuzman, M. et al. Am. J. Psychiatry 174, 557–565 (2017)). We have evidence that AN patients do not learn from negative prediction errors (unexpected losses), which may also explain their maladaptive response to hunger (10.2.e.eng [REDACTED]). Reward prediction errors are encoded by midbrain DA neurons. We demonstrated that the induction of a hyperresponsive state of DA neurons using chemogenetics in rats results in deficits in reversal learning (10.2.e.eng [REDACTED]) and hyperactivity (10.2.e.eng [REDACTED]), which are all features of AN. Taken together, these data support that alterations in the microbiome may change food-related decision making via modulating dopaminergic neurocircuitry.

We aim to unravel how changes in diet and the microbiome affect the sensitivity (of neural circuits) for hormones as leptin and ghrelin in their effect on food-related decision making and on development of obesity and anorectic behaviors. In order to do so, we will use rodent models that we established in our lab and use sophisticated technologies as optogenetics and fiber photometry that allow us to unravel at cellular level how dietary manipulations (including transfer of human stool to rodents) and hormones impact on food related decision making. The translational aspect of this project is guaranteed since this project is part of a larger EU project where the overall objective is to understand how the microbiome impacts on eating disorders (mostly focused on anorexia nervosa) and how this knowledge can be utilized to improve the treatment of these disorders.

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?

The main objective of this project is to unravel how changes in hormones like leptin and gut-brain signalling, that occur in models of eating disorders (such as exposure to diet-induced obesity or starvation models) affect neural circuits that are involved in food-related decision making. We focus on how peripheral manipulations (such as treatment with drugs that mimic or block the action of hormones like leptin and ghrelin or a change of microbiome), change the activity of brain circuits (with a focus on the lateral hypothalamus- mesolimbic dopamine neurocircuit) involved in food-related decision making (in models that capture the choice of food and food-related anxiety).

Research questions: 1. Does the microbiome of eating disorder patients (transferred to rodents) compared to controls accelerate development of anorectic behaviors in rodent models of eating disorders?

2. How do changes in microbiome and in hormones like leptin and ghrelin that are associated with eating disorders (such as anorexia nervosa and obesity) affect neural circuits involved in food-related decision making?

3. Which specific neurons are required for the effect of these hormones on food-related decision making?

4. Do these neurons change their properties upon exposure to dietary manipulations?

5. Does treatment with drugs that target the hypothalamus- mesolimbic dopamine neurocircuit suppress development of anorectic behaviors in rodent models of eating disorders?

We have extensive experience working with the activity-based anorexia model, obesity models and models that capture food related decision making. All techniques mentioned in the project are in place and we have extensive experience with them. It is the first time we will deplete and transplant microbiome. We are in touch with three research groups that have experience with this and who advise us (10.2.e.eng [REDACTED]).

Together the answers to these questions will clarify to what extent and how changes in diet and microbiome via hormones that modulate specific neural circuits affect food-related decision making. In the last decade we have implemented technologies that allow us to address these questions.

3.3 Relevance

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

The results of this study increase the knowledge about the mechanisms underlying the effects of dietary manipulations and microbiome on food-related decision making. It is important to unravel these mechanisms since they are relevant for eating disorders (ED) as anorexia nervosa and obesity. In both eating disorders, energy balance is out of healthy control. AN patients fail to eat sufficient amounts of food whereas obese patients often overeat unhealthy diets. A better understanding how malnutrition changes the brain and impacts on food-related decision making provides a basis for development of novel therapeutic interventions.

Insufficient and inadequate nutrition does not only play a major role in EDs but also in depression and several somatoform disorders, e.g. gastrointestinal discomfort and nausea; in addition, research in obesity, a worldwide epidemic, will profit from new scientific findings obtained in other weight-regulation disorders. Moreover, our results might lead to a greater insight into starvation-induced physical and mental processes important for the understanding of hunger-related sequelae in the third world. Current treatment strategies in EDs, including psychotherapy and nutritional rehabilitation, are at best moderately effective. Innovations are urgently needed but are unlikely to arise from improvements in psychotherapeutic methods. Several scientists have emphasised that "the ED field lags behind other psychiatric disorders in understanding responsible brain circuits and pathophysiology" (for a review see Kaye, W. H. et al. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 6, 37–57 (2011) or Schmidt, U. & Campbell, I. C. *Eur. Eat. Disord. Rev. J. Eat. Disord. Assoc.* 21, 425–427 (2013)). Thus, the understanding of the gut-brain interaction might help to develop more early and effective treatments "tailored" to the neurobiological characteristics of a certain individual. Specifically, insights into the microbiome and gut-brain interaction might help to determine a more individualised and healthy target weight, which is prognostically relevant in ED. We are in particular interested to determine whether certain species of microbiota are over or underrepresented in stool of AN patients (which will be determined in the EU consortium), we aim to associate these with behavioural and physical outcomes (in the consortium) and the transplantation studies in rodents allows to address the question whether these are transferred to rodents which then allows to unravel mechanistic aspects (such as changes in hormones and inflammatory markers). We focus on leptin, ghrelin and Glp-1 as these are known to modulate the activity of the midbrain dopamine system.

Via (inter)national consortia we have access to data from genome-wide association studies of anorexia nervosa and obesity (BMI). In a reverse translational approach, these data will be used to identify neurons that are enriched in genes associated with eating disorders (which here refers to anorexia nervosa and obesity, and we focus on food-related decision making). We will use this information to select the neurons that we focus on in this project. Similar types of neurons exist in humans and rodents in the neural circuits we study in this proposal.

3.4 Research strategy

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

Overall design of the project

To address how changes in the gut, induced by dietary (or microbiome) manipulations affect development of anorexia and obesity, we need to bridge different levels of understanding. Our project strategy comprises a set of experiments that together will provide insight into the mechanism how gut signalling impacts on food related decision making relevant to eating disorders.

As model for obesity we will either expose rodents to a diet composed of lard and 10-30% sucrose water on top of regular chow and water (the HFHS diet). We use different forms of food restriction which each provide conditions to address specific questions in the project. A. In cases where we investigate food-related decision rodents are given a fixed amount of food a day with the purpose of maintaining 90% of original body weight. This approach keeps rodents motivated to obtain food rewards in behavioural testing. Using this strategy development of obesity is suppressed (and a more healthy weight is achieved compared to feeding ad lib). B. In cases where we aim to investigate the processes that control initiation of meals (hunger) we food restrict rodents up to 24 hr (this allows to unravel the process of refeeding; as it induces a strong drive to eat, the neural circuits (and deficits) in refeeding can be studied this way), C. Finally we use a well established translational model for AN in which access to food is restricted in time (1-2 hrs) with access to running wheels (known as the activity-based anorexia (ABA) model). This latter model mimics the hyperactivity (increased running wheel activity), the anorexia (rodents with running wheels eat less in the restricted feeding time than when no running wheel is present) and metabolic and hormonal changes. The ABA model does not mimic disturbance of body image and other psychological aspects. Some of the latter are captured in the food-related decision making tasks where

taking of food is punished by for instance a mild electric food shock. This allows to investigate the mechanisms underlying inhibition of feeding under threat. Anorexia nervosa patients display high levels of anxiety in particular towards fatty foods.

To gain mechanistic insights, we will manipulate either the microbiome (using food restriction models A and C), hormone signalling (obesity model and food restriction models A,B and C) or neuronal activity in these models by providing microbiota (via gavage) from humans (AN patients and controls) after antibiotics treatment of rodents, peripherally or centrally inject feeding related hormones as leptin and ghrelin and ligands that mimic their action or opto- or chemo-genetically manipulate neurons that are responsive to feeding-related hormones as leptin and ghrelin.

We will record neuronal activity and behaviour in these rodents by A. measuring calcium induced fluorescence and electrical activity from defined neuronal populations B. observe behaviour in food-related decision making tasks (Pavlovian and instrumental) and in general behavioural test as elevated plus maze and open field, C. observe locomotion, food intake, body weight and take blood and stool samples.

Research strategy for specific questions: 1. Does the microbiome of eating disorder patients compared to controls accelerate development of anorectic behaviors in rodent models of eating disorders?

We will deplete the microbiome of rats by antibiotic treatment, followed by replenishment with human microbiome from stool (anorexia patients and controls) via gavage followed by exposure to the ABA model. We will take and analyse blood (hormone levels) and stool (microbiome) samples.

2. How do changes in microbiome and in hormones like leptin and ghrelin that are associated with eating disorders affect neural circuits involved in food-related decision making?

We will treat rodents with hormones like ghrelin and leptin and drugs that mimic or block their action or transplant human microbiome into rodents and record neuronal activity (using fiber photometry and other technologies that allow specific recording) from specific neurons of the hypothalamus and mesolimbic system and related it to performance in food-related decision making tasks.

3. Which specific neurons are required for the effect of these hormones on food-related decision making?

We will manipulate the activity of specific neurons (such as those responsive to leptin or ghrelin responsive) of the hypothalamus and mesolimbic system using opto- and chemo-genetics and determine the effect on food-related decision making tasks and development of obesity and/or anorexia

4. Do these neurons change their properties upon exposure of dietary manipulations?

We will expose rodents to specific dietary regimes (HFHS diet or food restriction models) and determine neuronal activity (using calcium-induced fluorescence) during performance or food-related decision making tasks and ex vivo (using slice electrophysiology).

5. Does treatment with drugs that target the hypothalamus- mesolimbic dopamine neurocircuit suppress development of anorectic behaviours or of obesity in rodent models of eating disorders?

We will treat rodents with hormones like ghrelin and leptin and drugs that mimic or block their action and determine their impact on development of anorexia in the ABA model or on development of obesity.

Although one might think that if addressing the first question would show that the transfer of stool from controls compared to stool from AN patients does not make a difference in the ABA model, we would not continue with question 2 and that this would result in a go-nogo decision. However, it could well be that food related decision making is affected independent of an effect in the ABA model. Hormones as leptin and ghrelin have already been implicated in obesity and AN. Thus also independent of the microbiome, it is still important to determine how these hormones and the neural pathways via which they act impact on the ABA model and obesity and food-related decision making.

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.

To unravel how changes in hormones like leptin and gut-brain signalling affect neural circuits that are involved in food-related decision making (see above), I here provide a basic outline of the experiments that address the research questions.

Research questions: 1. Does the microbiome of eating disorder patients (transferred to rodents) compared to controls accelerate development of anorectic behaviors in rodent models of eating disorders?

We will transfer stool of anorexia patients and controls to rats and expose these rats to the activity-based anorexia (ABA) model. We will use rats since we have extensive experience using rats in the ABA model. Stool will be delivered per gavage. We will take blood samples to determine hormone levels.

The ABA model combines food restriction and running wheel availability. It has been shown to adequately model weight loss, hyperactivity, amenorrhea, hormonal disturbances, learning deficits and brain volume loss similar to human AN (Frintrop, L. Seitz, J. J. Neurosci. Methods 293, 191–198 (2018); Adan et al Curr Top Behav Neurosci. 2011;6:229-50).

Microbiome manipulation: rats will be treated with antibiotics for 2 weeks to deplete their microbiome and subsequently provided with (human) microbiome by gavage administration of diluted stool samples from AN patients and controls.

We will obtain stool samples from 4 anorexia nervosa patients and that have a BMI lower than 15 and 4 aged matched lean controls. Both patients and controls will not be on a vegan, vegetarian or similar diet.

2. How do changes in microbiome and in hormones like leptin and ghrelin that are associated with eating disorders affect neural circuits involved in food-related decision making?

To test how microbiome and hormones affect neural circuits involved in food-related decision making we will a. transfer stool of anorexia patients and controls to rats or mice b. inject rodents with hormones like ghrelin and leptin or ligands that mimic or block their action and test how specific neurons, such as midbrain dopamine neurons, respond during exposure of rodents to food-related decision making tasks. Neuronal activity will be recorded using fiber photometry and related techniques, which requires a stereotactic injection with a virus that delivers a calcium-sensitive fluorophore and implantation of an optic fiber. In the tasks rodents can obtain palatable food items such as sucrose and in some experiments this comes with the risk of being punished by time-out periods (a period that rodents can not earn palatable food) and in some occasions a mild electric foot shock. We prefer to use rats, but in cases we aim to record from specific neurons we cannot record from in rats, we use specific mouse cre lines that allow to record from (cre-expressing) specific neurons. These rodents will be kept on a restricted feeding schedule to keep them motivated in tasks to obtain palatable food and to avoid them from becoming obese. It is the first time we will deplete and transplant microbiome. We are in touch with three research groups that have experience with this and who advise us (Prof John Cryan, Univ of Cork; Dr Jochen Seitz Universitätsklinikum RWTH Aachen; Prof Aletta Kraneveld, UU). In case we need to use mice to target specific neurons, we will repeat stool transplantation in mice to confirm that similar results are obtained across species. Microbiome analysis will be performed by a participating institute (Kiel, Germany) of the EU consortium this research is part of.

Detection of neuronal activity using calcium-sensitive fluorophores: rodents will be injected with viruses that deliver calcium-sensitive fluorophores to specific cells (mostly expressing a recombinase like cre) and an optic fiber or minicamera lens will be implanted above the injection site. (10.2.e.eng [redacted]).

Hormone and drug administration: rodents will be injected with ligands either intraperitoneally, subcutaneous, intravenous or intracerebroventricularly. In case of chronic administration we will repeatedly inject ligands and where possible infuse ligands using minipumps or via drinking water. We will also locally infuse ligands via a permanent intrabrain cannula in case we need to locally infuse ligands into the brain.

We will **implant** permanent intravenous or intrabrain cannulas, transponders and/or minipumps in selected experiments.

Food-related decision making behavioural tasks: food-restricted rodents will be exposed to auditory, visual and smell cues that signal food reward (Pavlovian experiments) or threat of punishment (a mild electric footshock). In instrumental versions of food related decision making tasks rodents have to press a lever, nose poke or lick to get access to food reward or withhold a response to avoid a mild punishment (denial of food reward or mild electric footshock) (10.2.e.eng [redacted]).

Food restriction: Apart from the ABA model, we will food restrict rodents by either withholding access to food for up to 24 hours followed by ad libitum access to food for at least 2 days or give rodents daily a fixed amount of food such that they maintain 90% of body weight as compared to their normal ad lib fed body weight.

3. Which specific neurons are required for the effect of these hormones on food-related decision making?

To unravel the neural circuitry that mediates the effect of hormones like leptin and ghrelin on food-related decision making we will map inputs to neurons involved in decision making such midbrain dopamine neurons and bring these neurons under opto- and chemogenetic control and related techniques (such as silencing by tetanus toxin light chain expression). We will determine the impact of these inputs on food related decision making and determine their requirement for the effect of hormones like ghrelin and leptin.

We will use mice for these experiments since we need to target specific neurons using the cre-loxP and related strategies. As new related strategy we will use FosCre(ER) mice (also known as MTRAP2 mice) (DeNardo, L. A. et al. Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. *Nature Neuroscience* 22, 460–469 (2019).), which allow to target neurons that are activated during exposure of mice to a certain conditions, such as the ABA model. In these mice, the cre recombinase gets expressed under control of the cFos promoter. The Fos promoter is active in activated neurons. Using FosCre(ER) mice allows us genetic access to manipulate neurons (that are activated upon exposure to a certain condition) with opto- and chemogenetics. For opto- and chemogenetics we need to inject mice stereotactically with virus that deliver light- and drug sensitive proteins. We will inject drug and hormones peripherally. In case of optogenetics, we will implant mice with optic fibers into their brain. Mice will be exposed to food-related decision making tasks. For anatomical mapping and optimization of viral injections we will only inject mice with viruses and sacrifice them after 3-5 weeks and slice brains for immunohistochemistry.

Optogenetics: rodents will be injected with viruses that deliver light-sensitive ion channel to specific cells (mostly expressing a recombinase like cre) and an optic fiber will be implanted above the injection site such that these neurons become light-sensitive.

Chemogenetics: rodents will be injected with viruses that deliver a drug-sensitive receptor to specific cells (mostly expressing a recombinase like cre) so that administration with drug only activates or inhibits these cells. (Boekhoudt et al *Neuropsychopharmacology*. 2017 May;42(6):1315-1325)

4. Do these neurons change their properties upon exposure of dietary manipulations?

Mice will be exposed to the ABA model, other restricted feeding paradigms or to obesogenic diet (such as high-fat-high-sucrose diet). To record from specific neurons, these mice will be injected with virus that label these neurons with fluorophores and that allow to determine connectivity. Slice electrophysiology and fiber photometry will be used to determine changes in electric properties of specific neurons

The **high-fat-high-sucrose diet** rapidly induces obesity and leptin resistance and we have established this model in both rats and mice (deGit et al *Int J Obes (Lond)*. 2018 Aug;42(8):1445-1457; laFleur et al *Int J Obes (Lond)*. 2007 Aug;31(8):1286-94). Exposure to this HFHS diet which on top of chow and water consists of access to a 10-30% sucrose solution and saturated fat (lard) results within weeks in adiposity and obesity

Slice electrophysiology: rodents will be perfused and brain slices prepared for electrophysiology to measure neuronal activity in genetically defined neuronal populations

5. Does treatment with drugs that target the hypothalamus- mesolimbic dopamine neurocircuit suppress development of anorectic behaviors in rodent models of eating disorders?

Rodents will be exposed to the ABA model and they will be treated with drugs that target neurons that are sensitive for hormones like leptin and ghrelin. We will also target specific neurons using chemogenetics, to test whether altering their activity impacts on the development of anorectic behaviors in the ABA model. We prefer to use rats, but if specific targeting of neurons is not possible in rats, we will use (specific strains of cre-)mice.

For drug delivery we will choose the route of administration we will either use repeated injections or minipumps based upon optimal efficacy and the least burden to the animal. In case we use chemogenetics, rodents will be injected with virus into the brain.

Species We will use rats and mice for these experiments, where we chose the best model to address the question. For instance, we will use rats for the ABA model because rats endure the ABA procedure better than mice: in the ABA model, typically rats get access for only 1 hour to food, whereas mice do not survive this protocol and are fed 2-3 hours depending on the susceptibility of the mouse strain that is used. We will use cre-mice in cases that we need to target specific neuronal populations that we can not

target in rats. We prefer to use the rat since this is the most commonly used laboratory animal for this model (including ours) and most literature data is available. We only use mice if rats cannot be used. We also have experience with the ABA model in the mouse. We use mice if: 1) genetically engineered mice are needed to answer the question or 2) the rat is not usable because the substance we want to test is not active in the rat.

Gender We will preferably use males for our experiments because we discovered that food-related decision making tasks generate more variable results in females than males, which are attributed to the estrous cycle (10.2.e.eng). As females are more susceptible to develop anorectic behaviors in the ABA model, we will use young female rats in case of exposure to the ABA model. These young female rats that are food-restricted lack an estrous cycle, and the behavioural responses are therefore less variable.

Strains of rodents: TH cre rats, Wistar, Long Evans, PtxCre mice, LepRcre mice, GHSR cre mice, FosCre(ER) mice, fluorescent reporter mice (GFP and TdTomato), NPY-cre mice, vGATcre mice, vGlutcre mice.

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.

Coherence between components of the project: (1) We will start by assessing the impact of microbiome on development of anorectic behaviour and on body weight in the ABA model and assess whether hormones like leptin and ghrelin are mediating factors. (2) We will test how hormones like leptin and a change in microbiome impact on neural circuits implicated in food-related decision making by recording neuronal activity during task performance. (3) We will test the requirement of specific neurons for the effects hormones on food-related decision making. (4) We dive deep into changes in plasticity of specific neurons when mice are exposed to ABA and obesogenic environment. (5) Finally we test whether targeting these specific neurons has therapeutic efficacy in the ABA model.

Thus, we will start by assessing the effect of gut-brain signalling (using manipulations with hormones and microbiome) on food-related decision making and on body weight, determine via which neurons effects are mediated, determine how these neurons change in the context of the experiments and finally test whether specific targeting of these neurons has therapeutic efficacy.

The project consists of components that can each be carried out separately. The outcomes of the components can lead to a refinement of the approach of another component. This is an iterative process in which the various components together provide insight. Rather than go/ no decisions, the outcome of one component refines the strategy in another. The parts together form a whole that gives more insight than each component on itself. For instance, once we know which subpopulation of leptin or ghrelin responsive neurons most strongly affect food-related decision making, we will focus more on these neurons and study whether these neurons change their properties when rodents are exposed to the ABA or HFHS model.

Part of this project is funded by an EU ERANET project on the microbiome in eating disorders (ED). In this ERANET project the goal is to utilize knowledge of the gut microbiome in ED and utilize it therapeutically by treatment with pre- and probiotics in patients. From this project we will obtain stool samples and our microbiome and blood samples will be analysed. We will relate changes in microbiome to changes in blood hormone levels and development of anorectic behaviors.

Since we hypothesize that hormonal changes (in for instance leptin and ghrelin) mediate the effects of an altered microbiome, we also test the effect of ligands that mimic or block the action of leptin- and ghrelin sensitive neurons likely involved in food-related decision making. We cannot do these experiments in the ABA or HFHS model since these hormones are already changed in these models and other factors caused by the alteration of body weight may impact on this neurocircuitry. We will also transplant microbiome to rodents not exposed to the ABA or HFHS model to determine whether the effect of the microbiome is present in normal weight rodents.

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	Energy balance model and Neuronal Mechanisms
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD1150020198686-1
2. Titel van het project : How hormones like leptin and gut-brain signaling affect neural circuitry of food-related decision making
3. Titel van de NTS : Hoe hormonen als leptine en darm-brein communicatie voedingsgerelateerd beslisgedrag beïnvloedt

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer : AVD1150020198686

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 04-08-2020
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 05-08-2020 en 07-10-2020
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 17-08-2020 / 04-09-2020
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 27-10-2020

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 10-09-2019
- Datum antwoord: 20-09-2019
- Gestelde vragen en antwoorden:

Uw brief

- U schrijft in uw brief dat u muizen wilt gaan gebruiken in plaats van ratten, maar het aantal aangevraagde ratten vermindert niet. Dit zou volgens de DEC voor de hand liggen. U geeft immers aan dat er affiniteit bij bepaalde stoffen is voor de muis (en mens), maar niet voor de rat. Kunt u duidelijk aangeven voor welke stoffen er ratten gebruikt gaan worden en voor welke stoffen er muizen gebruikt gaan worden? Uit uw

brief zou nu opgemaakt kunnen worden dat er (mogelijk zelfs tegen beter weten in) zowel muizen als ratten gebruikt worden voor bepaalde stoffen. Als u nog niet duidelijk is of er muizen of ratten gebruikt worden, dan dit graag aangeven en onderbouwen in de tekst.

We geven er de voorkeur aan experimenten (activity-based anorexia model; ABA) in ratten uit te voeren omdat de rat voor dit model het meest gebruikte proefdier is (ook bij ons) en de meeste literatuur gegevens beschikbaar zijn. Alleen als ratten niet gebruikt kunnen worden gebruiken we muizen. We hebben ook ervaring met het ABA model in de muis. We gebruiken muizen als: 1) genetische gemoficeerde dieren nodig zijn om de vraagstelling te beantwoorden of 2) de rat niet bruikbaar is omdat de stof die we willen testen niet in de rat werkzaam is. We kwamen er achter dat een MC4 antagonist waarvan bekend is dat die werkt in mens en muis, niet werkzaam is in de rat (daar was geen literatuur over). Dit leidt ertoe dat we dit experiment niet meer in ratten doen maar in muizen, maar de ratten zijn al gebruikt voor deze stof en er is dan ook geen vermindering in het aantal ratten. Ik sluit niet uit dat we in de toekomst nogmaals met dergelijke onverwachte situaties geconfronteerd worden, omdat we ook werken met nieuwe farmaca waarvan nog niet zo veel bekend is. We verwachten niet dat alle dieren waarvoor vergunning is aangevraagd ook daadwerkelijk gebruikt zullen worden. Omdat er altijd onvoorziene omstandigheden zijn (zoals we nu zagen met de MC4 antagonist) hebben we wat meer dieren aangevraagd dan in de praktijk nodig zal zijn. Immers je mag niet meer dieren gebruiken dan vergund, maar wel minder.

Projectvoorstel

- Algemeen: De DEC verzoekt u (naast de gewijzigde bijlage en NTS) een gewijzigd projectvoorstel in te dienen waarin u onderbouwt (bijvoorbeeld bij de strategie) waarom u naast ratten ook voor muizen kiest (in het licht van de stoffen waar het om gaat). Wijzigingen die nodig zijn naar aanleiding van bovenstaande vragen over de brief ook graag verwerken in het projectvoorstel. Graag alleen de wijzigingen die nu in het kader van deze wijziging aangevraagd worden in rood aangeven en niet de eerder gemaakte wijzigingen van de originele indiening.

Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij punt 1.2 'Drug treatment in the ABA model in mice' noemt u 360 muizen met een drop-out van 15%, maar deze 15% is niet gecompenseerd. Graag nog narekenen.
Ik zal 360 met 15% verhogen tot 424 muizen.
- U wilt muizen gaan gebruiken, maar geeft in de projectbeschrijving (3.4.2) aan dat ratten de ABA procedure beter doorstaan dan de muizen en dat u daarom bij voorkeur ratten gebruikt. De DEC leidt daaruit af dat het ongerief voor de muizen hoger zou kunnen zijn. Graag toelichten en aangeven of het ongerief nog in dezelfde categorie valt. Dit is nu nog niet aangepast in de aanvraag. Als het 'running wheel' de

belangrijkste factor in de mate van ongerief is, dan dit graag in verband brengen hiermee.

Het ongerief bij muizen is vergelijkbaar aan dat van de rat. Het ongerief wordt veroorzaakt omdat de dieren meer energie verbranden door loopwielactiviteit en de tijd dat ze toegang hebben tot eten minder voedsel tot zich nemen dan dieren die geen loopwiel hebben (en ook op hetzelfde voedselregime staan). De dieren raken door de negatieve energiebalans verzwakt en dat geeft het ongerief. Wat ik bedoel met beter doorstaan is dat de muis het model niet doorstaat als er maar 1 uur per dag voedsel gegeven wordt zoals bij de rat het geval is. Bij de muis wordt 2-3 uur per dag voedsel gegeven, en dit is afhankelijk van de muizenstam omdat niet iedere stam even gevoelig is voor het model (zie ook 10.2 .e. en g

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een wijziging op een bestaande vergunning.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De DEC is van mening dat deze aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Hoofddoel van dit project is om uit te zoeken hoe veranderingen in voeding-gerelateerde hormonen (zoals leptine, ghreline) en darm-hersenen communicatie in knaagdier modellen voor eetstoornissen (zoals blootstelling aan een dieet inducerende obesitas of aan honger modellen), neurale circuits beïnvloeden die betrokken zijn bij voedsel-gerelateerd beslisdgedrag om te veel te eten (obesitas) of te weinig te eten (zoals bij anorexia nervosa, AN). Recente studies hebben aangetoond dat de darmmicrobioom-samenstelling bij AN patiënten duidelijk is verstoord (dysbacteriose). Verder is aangetoond dat transplantatie van feces van muizen in een obesitasmodel naar zogenaamde "germ-free" (gnotobiotic) controle muizen obesitas induceerde. Een studie bij de mens heeft laten zien dat transplantatie van feces van gezonde mensen naar AN patiënten resulteerde in gewichtstoename. Veranderingen in het microbioom zijn dus zeer waarschijnlijk gerelateerd aan eetstoornissen, maar het is nog niet bekend via welke mechanismen dit verloopt. Uit de specifieke doelen van het project blijkt het basale karakter van het onderzoek: 1) Is het getransplanteerde microbioom van patiënten met AN naar een knaagdiermodel voor AN in staat de symptomen van AN in deze dieren te verergeren? 2) Hoe kunnen veranderingen in het microbioom en in hormonen, zoals leptine en ghreline, die gerelateerd zijn aan eetstoornissen, neurale circuits beïnvloeden die betrokken zijn bij voedsel-gerelateerd beslisdgedrag? 3) Welke

specifieke neuronen zijn betrokken bij deze hormoon effecten op voedsel-gerelateerd beslisgedrag? 4) Veranderen deze neuronen van eigenschappen tijdens dieetmanipulaties? En 5) Spelen hormonen, zoals leptine en ghreline of medicijnen die de werking van deze hormonen nabootsen of remmen een rol in het AN model of bij de inductie van obesitas. Verder wordt onderzocht of deze stoffen via hypothalamo-mesolimbische dopaminerge neurocircuits de ontwikkeling van het eetstoornisgedrag in muizenmodellen voor AN en obesitas kunnen remmen.

Het project stemt het meest overeen met voorbeeld 4B uit de Handreiking "Invulling definitie project".

De gevraagde wijziging heeft betrekking op het uitvoeren van een deel van de experimenten met muizen in plaats van met ratten, omdat gebleken is, dan wel de verwachting is, dat de stoffen die de onderzoekers willen testen niet altijd werkzaam zijn in ratten. Zo is tijdens de uitvoering van de experimenten gebleken dat een MC4 antagonist waarvan bekend is dat die werkt in mens en muis, niet werkzaam is in de rat (er was geen literatuur beschikbaar die daarop wees). De onderzoeker gebruikt bij voorkeur ratten, omdat de rat voor het gebruikte diermodel (activity-based anorexia model; ABA) het meest geschikt proefdier is en daarover de meeste literatuur gegevens beschikbaar zijn. De onderzoeker kan niet uitsluiten dat in toekomstige gevallen zal blijken dat ook andere te testen stoffen in ratten niet werken en wil dan de mogelijkheid hebben om uit te wijken naar muizen. Over de vraag of dit invloed heeft op het ongerief en het aantal te gebruiken dieren verwijst de commissie naar C11 en C15.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstellingen. *De gevraagde wijziging heeft hierop geen invloed.*

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is: 1) om uit te zoeken hoe perifere manipulaties (zoals de behandeling van AN en obesitas met medicijnen die de werking van hormonen zoals leptine en ghreline, stimuleren of remmen, en veranderingen in het microbiom) de modellen voor AN en obesitas beïnvloeden. En 2) om uit te zoeken hoe veranderingen in hersencircuits (gefocust op het laterale hypothalamus- mesolimbische dopaminerge neurocircuit) betrokken zijn bij voedsel-gerelateerd beslisgedrag (in modellen die de voedselkeuze en voedsel-gerelateerde angst kunnen vastleggen).

Het uiteindelijke fundamentele doel van het project is om meer inzicht te verkrijgen over hoe veranderingen in hormonen, zoals leptine en ghreline, en in darm-hersen communicatie (o.a. via cytokines), die voorkomen in modellen voor eetstoornissen, de neurale circuits beïnvloeden en die betrokken zijn bij voedsel-gerelateerd beslisgedrag in modellen voor voedselkeuze en voedsel-gerelateerde angst. Van belang is ook dat gefocust wordt op behandeling met medicijnen die de werking van hormonen nabootsen of remmen.