

Inventaris Wob-verzoek W17-05										
nr.	document NTS 2015154	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	Projectvoorstel			x						
3	Bijlage beschrijving dierproeven initieel			x						
4	NTS	x								
5	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
6	DEC advies				x		x	x		
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
8	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
9	Bijlage beschrijving dierproeven aangepast			x						
10	Formulier meldingen				x		x	x		
11	Begeleidende brief bij antwoorden				x		x	x		
12	Advies CCD aan bestuur		X							x
13	Beschikking				x		x	x		



22 JULI 2015

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

Ja > Vul uw deelnemernummer in 90500  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie BioXpert B.V.  
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted]

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

KvK-nummer 54838134  
 Straat en huisnummer Nistelrooise Baan 3  
 Postbus [Redacted]  
 Postcode en plaats 5374RE | Schaijk  
 IBAN NL72RABO0183605888

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

Tenaamstelling van het rekeningnummer BioXpert BV  
 (Titel) Naam en voorletters [Redacted]  Dhr.  Mw.  
 Functie [Redacted]  
 Afdeling Viroclinics Biosciences B.V.  
 Telefoonnummer [Redacted]  
 E-mailadres [Redacted]

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters [Redacted]  Dhr.  Mw.  
 Functie [Redacted]  
 Afdeling Viroclinics Biosciences B.V.  
 Telefoonnummer [Redacted]  
 E-mailadres [Redacted]



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

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of *dierproef* waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of *dierproef* waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6
- 

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |               |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 8 - 2015  |
| Einddatum  | 31 - 7 - 2016 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de potentie van een respiratoir syncytieel virus (RSV) F eiwit vaccin en een Adenoviraal RSV-F vaccin om antistoffen op te wekken tegen RSV in jong volwassen cavia's.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |            |
|-------------|------------|
| Naam DEC    | DEC Leiden |
| Postadres   |            |
| E-mailadres | [REDACTED] |



## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- 

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[REDACTED]
Functie	Vergunninghouder
Plaats	Schaijk
Datum	23 - 6 - 2015
Handtekening	[REDACTED]



**BioXpert B.V.**

Nistelrooise Baan 3  
5374 RE Schaijk  
The Netherlands  
T: +31 (0) 486-463303  
F: +31 (0) 486-463498

[info@bioxpert.nl](mailto:info@bioxpert.nl)  
[www.bioxpert.nl](http://www.bioxpert.nl)

**Aan:** Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

**Datum:** 18 juli 2015

**Betreft:** Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD905002015154

Geachte heer / mevrouw,

Bijgaand de getekende aanvraag Projectvergunning Dierproeven AVD905002015154 met als titel:

*RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs.*

Deze aanvraag is vandaag met de beveiligde e-mailverbinding ingediend.

Met vriendelijke groet,



## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

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

In the context of vaccine and antiviral compound (hereafter referred to as "antiviral intervention strategies") development, Viroclinics Biosciences offers preclinical models in which these strategies can be tested in relevant in vivo settings. Different animal models are available for studying intervention strategies against respiratory syncytial virus (RSV), that all have their strengths and weaknesses. The

choice for a particular animal model will depend on the study objective in question. This is discussed in detail with the sponsor during design of the studies. Of all preclinical models for RSV infection, the guinea pig is the most optimal model for our objective since placentation and transplacental transport of antibodies is comparable in guinea pigs and humans.

This model can be used to assess the characteristics of a multitude of antiviral intervention strategies, be they (monoclonal) antibody preparations, antiviral pharmaceutical substances, vaccines, or a combination thereof.

This project proposal aims at investigating the immunogenicity of newly developed RSV vaccines in the guinea pig model. The results will be used to determine the most optimal prime-boost regimen to be able to assess transplacental transfer of RSV specific maternal antibodies to pups in future studies, which will be subject of another project proposal to be completed after conclusion of this study.

---

### 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 studies described in this project proposal address the testing of newly developed biological products with regards to their immunogenicity, i.e. their capacity to induce RSV neutralizing antibody responses in guinea pigs.

The outcome of the studies in this project will be used to design future studies to test the efficacy of new candidate RSV vaccines to generate protective immunity in newborn guinea pigs in a maternal vaccination model.

---

### 3.3 Relevance

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

In general, RSV causes relatively mild common cold-like upper respiratory tract infections in individuals of all ages. However, RSV also plays a major part in the annual number of people succumbing to lower respiratory tract infections; global RSV disease burden is estimated at 64 million cases and 160000 deaths every year (WHO, 2009). Especially vulnerable target populations include newborns, children below the age of 2, elderly, individuals with underlying co-morbidities like heart and lung diseases or immunocompromised individuals.

Even after extensive research and development, a vaccine for any of the above groups is still not available. RSV vaccine research is still severely hampered by a failed trial in the 1960s in which an Alum-adjuvanted formalin-inactivated RSV vaccine primed for enhanced disease rather than protecting those vaccinated. Since then numerous vaccination strategies have been explored, however since RSV infection continues to occur, even in sero-positive individuals, vaccines have to do "better" than the infection itself. Additionally, an important target for protection against disease are the very young, but vaccination is either difficult or not in time to protect against disease which mostly occur very early after birth. To protect the very young, maternal vaccination during pregnancy is an important point to consider. Prenatally, maternal antibodies are actively transferred to babies through the placenta and as such could provide prophylactic protection against subsequent infection during early life. Enhanced disease as seen in the 1960s is not applicable since the mothers have been in contact numerous times with RSV and are therefore not prone to develop enhanced disease and additionally this enhanced disease is not transferrable from mother to child. Thus, vaccination strategies aimed at inducing high levels of antibodies in pregnant mother are important candidate vaccines to be used against protection of young babies. Alternatively, vaccines that prove to be very immunogenic in the proposed model could also be used in other target populations at risk.

A number of RSV vaccine candidates are in development of which vaccines based on the RSV fusion (F) protein are the most promising candidates. The RSV F protein is one of three glycoproteins of RSV and a major target against which immunological responses are generated. Also, the RSV F protein is highly conserved between different strains of RSV, in contrast to the attachment (G) protein, and is highly expressed, in contrast to the M2 protein, after infection. Therefore the RSV F protein represents an important target able to induce broad reaction when used as vaccine antigen. Finally, a monoclonal antibody with neutralizing capacity that targets the RSV F protein (Synagis) has been shown to reduce

---

RSV disease burden (through a significant reduction of hospitalizations) in high-risk infants. Since in general proteins themselves are not very immunogenic, the immune response during vaccination may have to be boosted by the use of an appropriate, clinically relevant, adjuvant (Adjuphos). This adjuvant has been shown to be effective without the occurrence of adverse effects in several preclinical models, including mice, cattle, and macaques (de Swart, J. *Viol*, 2002; de Waal, *Vaccine*, 2004; Kateregga, *BMC Vet Res*, 2012).

An additional vaccination strategy against RSV are either attenuated RSV viruses or recombinant (either replication deficient or not) viruses expressing one or more RSV proteins. However, use of attenuated RSV viruses could pose a problem, because it has been shown that it is difficult to find a proper balance between attenuation and immunogenicity. Additionally, since infection with the wild-type viruses does not induce life-long immunity, the attenuated virus has to do better than the wild-type. Recombinant viruses, either or not replication deficient, could be better candidate vaccines, since expression of the transgene (main target for the immune response) can be driven by the choice of the vector. In the current study a replication competent adenovirus type 35 construct will be used. This type is less abundant in the human population compared to other adenovirus types, and pre-existing immunity against the vector is therefore less likely to impair its immunogenicity. Since this vector can replicate in the host, the transgene is highly expressed and therefore it is suggested that high levels of protection can be achieved after vaccination.

A number of animal models are available to investigate efficacy against RSV infection, and which one is to be used depends on the objective of the study. In cases where the objective is to study the potential of maternal vaccination strategies against RSV, the guinea pig is the most relevant, since the placentation of the guinea pig is comparable to humans and antibodies are transferred from the mother to the foetus via similar transplacental transport mechanisms. Maternal immunity is the main early defence against infectious agents in newborns. Transfer of IgG is transported through either the colostrum or the placenta. Of the (5) different classes of antibodies, only IgG can be transferred through the placenta. The number of membranes separating the maternal and foetal blood circulation determines the placenta types found in different species: epitheliochorial, synepitheliochorial, endotheliochorial or hemochorial. Humans and guinea pigs have hemochorial placentas, through which maternal IgG transfer is mediated by neonatal Fc receptors (FcR), which are specific for the Fc portion of IgG.

Guinea pig gestational periods are lengthy compared to other rodents, ranging from 65-70 days (Bai, *Rev Infect Dis.*, 1983), through which the relative length of pregnancy and the development of the young at the time of delivery closely resemble that of humans.

As the guinea pig has a placental architecture which is similar to that of humans, and there is prenatal transfer of antibodies to the foetus, this model has been established for research into infectious diseases, especially prevention and treatment of maternal-foetal transmission of cytomegalovirus (Schleiss & McVoy, *Future Virol.*, 2010). Also, maternal immunization against RSV has been studied in guinea pigs. Pups born to immune mothers (by RSV infection) have been shown to acquire serum-neutralizing antibodies to RSV and shown significant protection compared to pups born from non-immune mothers (Buraphacheep, *JID*, 1997). These features render the guinea pig a useful model to study trans-placental transfer of (RSV specific) antibodies and maternal immunization strategies against RSV.

---

### **3.4 Research strategy**

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

The results of the study carried out in the context of the current project will be used to develop an animal model to test the influence of maternally derived antibodies (MDA) against RSV infection in young infants. To this end, the appropriate model has to be chosen with the highest relevance for human testing. Since placentation of the guinea pig shows similarities with the human placentation this is an appropriate model. The vaccination strategies described in this project proposal have not been tested yet in this model. The current study is described in which the induction of the immune response is characterized after different vaccination strategies with regards to dose and adjuvation, but also vector. The results from this study will be used for future studies in which the trans-placental transport of these responses is investigated.

To investigate the immunogenicity of the recombinant RSV F protein (designated PRPM.CHO) different doses of this protein are used in a prime-boost regime in the presence or absence of a clinically-relevant adjuvant, Adjuphos. This adjuvant has been shown to be effective without the occurrence of adverse effects in several preclinical models, including mice, cattle, and macaques (de Swart, J. *Viol*, 2002; de



Waal, Vaccine, 2004; Kateregga, BMC Vet Res, 2012). Results will be analysed and the optimal vaccination regimen with regard to the induction of neutralizing antibodies will be selected for future studies on MDA in guinea pigs and their efficacy against infection with RSV in pups.

The recombinant adenovirus vector (Ad35 strain) expressing the RSV-F protein has never been used as vaccination regime in a preclinical setting and therefore this vaccine candidate is taken along in this study as proof of concept in a single vaccination regime (prime only). If results show good induction of immune responses against this adenovirus vector, future studies will aim at the appropriate dose of this vector.

Main objective of the study is to show the induction of functional antibody responses as measured by neutralization. However, since the correlates of protection against infection with RSV and the efficiency of the transport of antibodies through the placenta are not known, a threshold on the level of antibody responses cannot be determined.

Summarizing, the objective of the project is to test the immunogenicity of the following RSV candidate vaccines in young adult female guinea pigs:

- Different doses of the PRPM.CHO RSV F derived protein, a candidate vaccine consisting of a recombinant RSV fusion (F) protein, using a prime boost regimen, delivered either with or without the adjuvant AdjuPhos.
- A recombinant adenovirus vector (Ad35 strain) containing an insert that drives expression of the RSV F protein.

---

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.

---

RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs (see schedule below):

1. After entry in the animal facilities the animals are housed for group 1-7 during the complete experiment under DM-I and for group 8 and 9 during acclimatization under DM-I and from day 0 onwards under DM-II conditions.
2. Animals receive a subcutaneous identification chip after an acclimatization period of minimal 7 days
3. On day 0 animals will be weighed, blood will be collected from all animals and all animals receive intramuscular or intranasal vaccination (group 1-7 and group 8, respectively) or intranasal infection (group 9) under isoflurane sedation.
4. On day 7 and 14 animals will be weighed without sedation
5. On day 28 animals will be weighed and blood will be collected under isoflurane sedation
6. On day 35 animals will be weighed, blood will be collected from all animals and animals from group 1-7 receive intramuscular vaccination under isoflurane sedation
7. On day 42 and subsequently every 7 days animals will be weighed and additionally blood will be collected from all animals on day 49 and 63 under isoflurane sedation.
8. On day 77 all animals will be euthanized by exsanguination under isoflurane sedation, followed by a lethal sodium pentobarbital dose.

NB: total collected blood volume will not exceed the total amount of 8 ml/kg/28 days

---

### Study schedule: Immunisation & Sampling

Group	No/Group	Immunisation & sampling							
		d 0 Sample + Prime	d 28 Sample	d 35 Sample + Boost	d 49 Sample	d 63 Sample	d 77 Final Sample		
1	7	B	0.5 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	0.5 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	B
2	7	B	5 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	5 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	B
3	7	B	25 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	25 µg PRPM.CHO + AdjuPhos, IM	B	B	B
4	7	B	0.5 µg PRPM.CHO, IM	B	B	0.5 µg PRPM.CHO, IM	B	B	B
5	7	B	5 µg PRPM.CHO, IM	B	B	5 µg PRPM.CHO, IM	B	B	B
6	7	B	25 µg PRPM.CHO, IM	B	B	25 µg PRPM.CHO, IM	B	B	B
7	7	B	PBS	B	B	PBS	B	B	B
8	7	B	Ad35.Fdcp 10 <sup>10</sup> vp, IM	B	B	n.a.	B	B	B
9	7	B	10 <sup>5</sup> pfu RSV-A2, IN	B	B	n.a.	B	B	B

HOUSING	NORMAL/DM-II*
---------	---------------

\* All animals will be housed in groups in normal cages. After priming, housing of groups 8 and 9 will be in DM-II conditions.

**Abbreviations:**

IM = intramuscular

IN= intranasal

B = whole blood for serum

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.

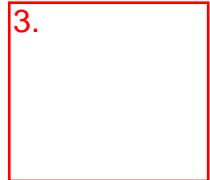
The study is designed to evaluate the immunogenicity of various doses of the PRPM.CHO protein with and without adjuvation with AdjuPhos (Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark), in a prime-boost regimen in guinea pigs. Increasing protein doses will be used (0.5, 5 and 25µg per vaccination; groups 1 to 3 and 4 to 6) to determine the immunogenicity. Groups with and without AdjuPhos will be used to determine the immunostimulatory effect of a licensed adjuvant (AdjuPhos) for this protein vaccine preparation (groups 1 to 3 vs. groups 4 to 6). For adjuvation of antigen two different kinds of adjuvant can be used: negatively (e.g. AdjuPhos) or positively (e.g. Alhydrogel) charged. Choice of the adjuvant will depend on the charge of the antigen. In this case the antigen is positively charged, therefore the negatively charged AdjuPhos will be used.

Moreover, as a pilot, the immunogenicity of a high dose of Adenovector with an RSV F gene insert (Ad35.Fdcp) will be evaluated (group 8, prime only).

As gatekeepers, two control groups are included in which the animals are either i.m. injected with PBS (negative control, group 7), or primed with a high dose of RSV-A2 intranasally (positive control, group 9).

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	RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	90500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	BioXpert	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	1	RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs

### 2 Description of animal procedures

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

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

The Sponsor of the study is aiming to develop a RSV vaccine for prevention of RSV infections in young children.

The study is performed to assess the in vivo immunogenicity in guinea pigs of a) a recombinant PRPM.CHO protein when used as a prime-boost immunization and b) an Adenovector driving expression of RSV F. The PRPM.CHO protein is produced in CHO cells and is a processed variant of the pre-fusion RSV-A2 F protein, containing quintuple (5) mutations.

The concrete objectives of the study are the following:

1. Immunogenicity of different doses of the PRPM.CHO RSV F derived protein in guinea pigs in a prime boost regimen, delivered with and without AdjuPhos.
2. Immunogenicity of an Ad35 vector containing the insert of the RSV F protein in guinea pigs.

The level of RSV neutralizing Ab titers as determined by VNA on serum samples collected at day 49, will be used as primary outcome parameter. The results will be used to determine the most optimal prime-boost regimen to assess transplacental transfer of RSV specific maternal antibodies to pups in future studies, which will be subject of another project proposal to be completed after conclusion of this study.

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

The study is designed to evaluate the immunogenicity of various doses of the PRPM.CHO protein with and without adjuvation with AdjuPhos (Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark), in a prime-boost regimen in guinea pigs. Increasing protein doses will be used (0.5, 5 and 25µg per vaccination; groups 1 to 3 and 4 to 6) to determine the immunogenicity. Groups with and without AdjuPhos will be used to

determine the immunostimulatory effect of a licensed adjuvant (AdjuPhos) for this protein vaccine preparation (groups 1 to 3 vs. groups 4 to 6). For adjuvation of antigen two different kinds of adjuvant can be used: negatively (e.g. AdjuPhos) or positively (e.g. Alhydrogel) charged. Choice of the adjuvant will depend on the charge of the antigen. In this case the antigen is positively charged, therefore the negatively charged AdjuPhos will be used. This adjuvant has been shown to be effective without the occurrence of adverse effects in several preclinical models, including mice, cattle, and macaques (de Swart, J. Virol, 2002; de Waal, Vaccine, 2004; Kateregga, BMC Vet Res, 2012). Moreover, to determine the immunogenicity of a high dose of Adenovector with an RSV F gene insert (Ad35.Fdcp) will be evaluated (group 8, prime only).

The animals will be vaccinated intramuscularly (i.m.) at day 0 (prime) and day 35 (boost) after which the immune response is studied for 42 days (6 weeks).

The maximum volume to be applied i.m. will not exceed 0.1 ml per injection site with a maximum of two injection sites/inoculation.

During the experiment blood will be collected from the animals at days 0 (pre vaccination), 28, 35, 49 and 63. Collection of blood (from the vena cava cranialis) and administration of prime and boost formulations will be performed under isoflurane anesthesia. The blood collection volumes will not exceed 8 ml/kg/28 days. On day 77 all animals are euthanized by exsanguination under isoflurane anesthesia, followed by a lethal sodium pentobarbital dose.

In the experiment two control groups are included in which the animals are either i.m. injected with PBS (day 0 and day 35, negative control, group 7), or primed at day 0 with a high dose ( $10^5$  PFU/animal) of RSV-A2 intranasally (positive control, induction of F protein specific immune responses in the context of a natural infection, group 9).

Groups and administration specifics are given below:

Group	Prime		Boost		n=	adjuvant	route
	Item	Dose	Item	Dose			
1	PRPM	0.5 µg	PRPM	0.5 µg	7	AdjuPhos	i.m.
2	PRPM	5 µg	PRPM	5 µg	7	AdjuPhos	i.m.
3	PRPM	25 µg	PRPM	25 µg	7	AdjuPhos	i.m.
4	PRPM	0.5 µg	PRPM	0.5 µg	7	-	i.m.
5	PRPM	5 µg	PRPM	5 µg	7	-	i.m.
6	PRPM	25 µg	PRPM	25 µg	7	-	i.m.
7	PBS	-	PBS	-	7	-	i.m.
8	Ad35.Fdcp	$10^{10}$ vp	-	-	7	-	i.m.
9	RSV-A2	$10^5$ pfu	-	-	7	-	i.n.

During the study the animals will be observed daily for general health checks, morbidity and mortality. Bodyweights will be determined at the start of the study, and once every week during the duration of the experiment.

Using the blood samples collected on the days mentioned above, the immunogenicity of the various formulations will be assessed by serological analysis in an RSV specific virus neutralization assay.

#### Data analysis

The primary aim of the experiment is to explore the dose response of the adjuvanted and non-adjuvanted PRPM.CHO, a recombinant RSV-A derived F protein, in guinea pigs. Furthermore, immunogenicity of an Ad35 vector containing the insert of the RSV F protein will be evaluated. As an exploratory analysis, the mean VNA titer ( $\log_2$ ) and the standard deviation will be calculated for each group.

Immune responses on days 28, 35, 49, 63 and 77 will be evaluated by comparing VNA titers in Groups 1-6 and 8 with Group 7. Since it is expected that all animals of Group 7 will have Ab titers at the lower limit of quantification (LLOQ), a Wilcoxon Rank Sum test will be used for these comparisons and a Bonferroni correction for multiple testing will be applied. The consecutive serum samples will be used to

assess the kinetics of RSV neutralizing antibody development, i.e. sera obtained on days 63 and 77 will provide information on the longevity of the antibody response.

The effect of AdjuPhos on the immune responses will be determined by comparing Groups 1-3 with Groups 4-6 across doses. An analysis-of-variance for potentially censored measurements will be applied to the log2-transformed VNA titres. The statistical model contains dose and adjuvant (as defined in the group scheme above) as explanatory factors.

Gate keepers:

Group 7: serves as a negative control group for the experiment

Group 9: serves as a positive control group for the experiment

The level of RSV neutralizing Ab titers as determined by VNA on serum samples collected at day 49, will be used as primary outcome parameter.

The experiment will be considered valid if group 9 shows significantly higher RSV neutralizing Ab titers than Group 7 in serum collected at day 49 after immunization.

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

Power calculation.

Since this is the first study in which the effect of prime- boost immunization with PRPM-CHO protein (Groups 1-6) and with a prime immunization with Ad35.Fdcp (Group 8) is performed in guinea pigs, no exact power calculation for the size of the treatment or the control groups (Groups 7 and 9) can be performed. Data obtained in this study will be used for power calculations for future experiments. As an estimation, using a power analysis assuming continuous, normally distributed results, based on  $\alpha=0.05$ , power=0.8 and SD of 4 and a difference between groups of 6 (log2 transformed VNA titers), the required group size is estimated to be 7 ( $N=2*(2.8*SD)/(mean1-mean2)^2$ ).

## **B. The animals**

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

Species: Outbred SPF female guinea pigs (Dunkin Hartley strain). For justification of this animal model see refinement in D.

Origin: registered breeder.

Life stage: 6-8 weeks of age at the start of the study.

This part of the study will be performed with females, since the outcome of this study will be used to assess transplacental transfer of maternal antibodies to pups in future studies. The life stage is chosen since future studies will require the use of female guinea pigs that are capable to reproduce.

Estimated numbers: a maximum of 63 animals (9 groups of 7 animals).

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

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

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

Replacement: This study is designed to generate immunogenicity profiles of vaccine preparation that are to be used in future studies in which transplacental transfer of maternal antibodies will be assessed. Therefore, the immunogenicity needs to be assessed in the same animal model, the guinea pig. There is no in vitro system available that allows immunogenicity assessment of vaccine preparations.

Refinement: the guinea pig was chosen as an animal model because the results of this study will be used

to design a future study in which the influence of maternally derived antibodies on the immunogenicity and efficacy of candidate RSV vaccines will be addressed, the ultimate goal of the Sponsor. Trans-placental transfer of maternal antibodies in guinea pigs is similar to that in humans (Borghesi, Open J. of Anim. Sciences, 2014). These features, including the guinea pig's reproductive characteristics and susceptibility to RSV (Buraphacheep, JID, 1997) makes this the model of choice to perform the study described in this proposal, and also limits the use to female animals only.  
Reduction: statistical analysis provided in section A ensures maximum likelihood of significant results using a minimum number of animals.

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

1) The animals will be housed in groups, in specific cages that include enrichment assets. Throughout the study, the animals will be observed daily to assess their general health status. Sampling and administration procedures are performed by qualified personnel and under anaesthesia to minimize discomfort and stress.

2) The experiment will be performed under DM-I conditions, except for animals that receive Adenovector and/or RSV preparations, which will be housed under DM-II conditions after administration of these preparations. All procedures will be performed in DM-I or DM-II equipment/facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

Not applicable.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Sampling and administration procedures are performed by qualified personnel and under anaesthesia to minimize discomfort and stress.

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

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

In the animals that will be challenged with RSV, mild transient respiratory symptoms may be observed.

Explain why these effects may emerge.

Mild, transient respiratory symptoms may occur because of the RSV infection.

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

Throughout the study, the animals will be observed daily for their general health status. Animals will be weighed weekly, when there is an indication for weight loss, weighing will be done daily. Humane endpoints are defined.

### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

- The animal does not drink or eat anymore
- Reduction of body weight greater than 20% compared to the initial weight
- More than moderate circulation or respiratory issues
- Behaviour and movements of the animal are more than moderately deviating from routine

Indicate the likely incidence.

Not very likely as clinical symptoms arising because of RSV infection are uncommon and not considered lethal in this model.

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

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

Sampling of blood under anaesthesia: mild

Sampling of blood and administration of immunogens under anaesthesia: mild

Symptoms due to infection with RSV: moderate

## **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

At the end of the study the animals will be euthanised as they will not be useful/suitable for other studies/purposes.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

██████████  
Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD905002015154

**Bijlagen**

2

Datum 21-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ██████████,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 juli 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002015154. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

#### **Wacht met de uitvoering van uw project**

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

#### **Factuur**

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

#### **Meer informatie**

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



Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven


Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

#### Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 90500  
Naam instelling of organisatie: BioXpert BV  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:   
KvK-nummer: 54838134  
Straat en huisnummer: Nistelrooise Baan 3  
Postcode en plaats: 5374 RE SCHAIJK  
IBAN: NL72RABO0183605888  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: BioXpert BV

#### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:   
Functie:   
Afdeling: Viroclinics Biosciences B.V.  
Telefoonnummer:   
E-mailadres: 

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Afdeling: Viroclinics Biosciences B.V.  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Afdeling: BioXpert  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 augustus 2015  
Geplande einddatum: 31 juli 2016  
Titel project: RSV-F protein and adenoviral vaccine immunogenicity in quinea pigs  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de potentie van een respiratoir syncytieel virus (RSV) F eiwit vaccin en een Adenoviraal RSV-F om antistoffen op te wekken tegen RSV in jong volwassen cavia's.  
Naam DEC: DEC Leiden  
E-mailadres DEC:

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:



Functie:

Vergunninghouder

Plaats:

Schaijk

Datum:

23 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD905002015154

**Bijlagen**

2

Datum 21-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 21 juli 2015

Vervaldatum: 20 augustus 2015

Factuurnummer: 201570154

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015154	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

# DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD905002015154
2. Titel van het project: RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs.
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar de potentie van een respiratoir syncytieel virus (RSV) F eiwit vaccin en een Adenoviraal RSV-F vaccin om antistoffen op te wekken tegen RSV in jong volwassen cavia's.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: DEC Leiden
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon:  
[REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 24-06-2015
  - aanvraag compleet: 06-07-2015
  - in vergadering besproken: 02-07-2015
  - anderszins behandeld: aanvullende informatie is via e-mail ronde besproken.
  - termijnonderbreking(en) van / tot
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 06-07-2015
  - advies aan CCD: 17-07-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
  - N.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 03-07-2015

- Strekking van de vragen: De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de controle groepen, het ongerief en de berekening.
  - Datum antwoord: 06-07-2015
  - Strekking van de antwoorden: de aanvraag is gecompleteerd.
  - Naar aanleiding van de vragen en suggesties van de DEC zijn het projectvoorstel en de NTS naar tevredenheid aangepast.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise: proefdiergeneeskundige praktijk
  - Deskundigheid expert: proefdierkundig adviseur met uitgebreide veterinaire ervaring.
  - Datum verzoek: 26-06-2015
  - Strekking van het verzoek: De DEC heeft gevraagd of de dodingsmethode en de toepassing van de anesthesie en analgesie volgens de Richtlijn zijn. De expert heeft dit bevestigd.
  - Datum expert advies: 02-07-2015

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

1. Het project is vergunningplichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectvergunningsaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

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

1. Het project is:
  - ✓ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
  - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord

- wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling te weten; het verkrijgen van inzicht in de werkzaamheid van nieuwe vaccins en vaccinconcepten, zoals het vaccineren van moeders ter bescherming van kinderen, tegen virale infecties met RSV. Dit wordt ingeschat als een substantieel belang. Jaarlijks sterven er meer dan 160.000 mensen aan de gevolgen van een RSV infectie. Meer inzicht draagt bij aan vermindering van ziekte- en sterfgevallen die het gevolg zijn van een virale infectie met RSV en de aanvraag dient daarmee een belangrijk maatschappelijk doel. Het wetenschappelijk belang wordt door de DEC substantieel geacht. Fundamenteel wetenschappelijke kennis van de immunogeniciteit van nieuw ontwikkelde RSV vaccins vormt de basis voor het ontwikkelen van antivirale interventie strategieën tegen RSV en is van essentieel belang voor verder onderzoek naar transplacentale overdracht van RSV specifieke maternale antistoffen. De DEC erkent dat er ook partijen zijn die een ander standpunt hebben met betrekking tot het ontwikkelen van vaccins. Deze belangen acht de DEC echter beperkt en wegen volgens de DEC niet op tegen het grote wetenschappelijk en maatschappelijk belang. De DEC onderschrijft dat, gezien de commerciële aard van de instelling, er een beperkt financieel belang is. Dit is volgens de DEC echter ondergeschikt aan het wetenschappelijke en maatschappelijk belang.
4. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
6. Het ongerief gepaard gaande met de technische handelingen waaraan het dier wordt onderworpen, wordt als gering ongerief ingeschat. In sommige gevallen kan er sprake zijn van matig ongerief als gevolg van de mogelijke bijwerkingen van de vaccinatie. Het cumulatieve ongerief wordt daarom door



de DEC als matig ingeschat, welk overeenkomt met het niveau van cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

7. In het project wordt de keuze voor het diermodel duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren zijn dieren die het minst gevoelig zijn voor pijn, lijden, angst of blijvende schade en de desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Naar het oordeel van de DEC zijn er geen alternatieven beschikbaar voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Ondanks dat er geen exacte powerberekening kan worden uitgevoerd acht de DEC het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt
9. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de verfijning van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

## **D. Ethische afweging**

Het fundamenteel wetenschappelijke onderzoek in dit project is van substantieel belang en van aangetoonde excellente kwaliteit. De DEC is van mening dat de resultaten zullen bijdragen aan het verkrijgen van meer kennis van de immunogeniciteit van nieuw ontwikkelde RSV vaccins en een beter wetenschappelijk inzicht in de werkzaamheid van nieuwe vaccins en vaccinconcepten tegen virale infecties met RSV. De DEC acht het belang van de fundamenteel wetenschappelijke doelstelling substantieel en schat de kans op het realiseren van de doelstellingen in als hoog. De verkregen fundamenteel wetenschappelijke kennis is essentieel voor verder onderzoek naar transplacentale overdracht van RSV specifieke maternale antistoffen. Het maatschappelijk belang is daarmee groot.

De onderzoeksgroep beschikt over een ruime ervaring met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde typen dierproeven.

Bij de uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende licht tot matig ongerief bij de dieren gerechtvaardigd.

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag
- 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 een ministeriële ontheffing vereist
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden

✓ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen**

### 2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.  
t.a.v. [REDACTED]  
Nistelrooise Baan 3  
5374RE Schaijk

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproe  
ven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD905002015154

**Uw referentie**

-

**Bijlagen**  
1

Datum 10 augustus 2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 18 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs" met aanvraagnummer AVD905002015154. In uw aanvraag zitten voor mij nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

**Onduidelijkheden**

In uw aanvraag worden de humane eindpunten als volgt beschreven:

- The animal does not drink or eat anymore
- Reduction of body weight greater than 20% compared to the initial weight
- More than moderate circulation or respiratory issues
- Behaviour and movements of the animal are more than moderately deviating from routine.

Het exacte punt waarop deze eindpunten bereikt worden is niet duidelijk gesteld in deze beschrijving. Bijvoorbeeld, hoe lang moet een dier niet meer eten/drinken alvorens men ingrijpt? Hoe wordt bepaald of een dier niet meer eet/drinkt, aangezien de dieren in groepen gehuisvest zijn? Wat betreft de afname in lichaamsgewicht moet genoemd worden dat cavia's na 6-8 weken nog doorgroeien en een afname van 20% van het initiële lichaamsgewicht is dus een drastische afname ten opzichte van het te verwachten gewicht in de loop van de studie. Ook het derde en vierde humane eindpunt geven niet een duidelijke interpretatie-vrije omschrijving van het eindpunt.

Graag ontvangen wij een heldere omschrijving van de humane eindpunten zodat op de werkvloer geen interpretatieverschillen kunnen optreden.

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

**Leges**

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

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

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt.

**Wanneer een beslissing**

Zodra wij de aanvullende informatie hebben ontvangen nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Zodra de leges zijn ontvangen, krijgt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

**Datum**

10 augustus 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD905002015154

**Aan:** IvD BioXpert, CCD

**Betreft** Aanvullende informatie onderzoeksplan getiteld: RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs. (CCD nr: AVD905002015154).

**Datum:** 11 augustus 2015

Beste leden van de IvD / Geachte leden van de CCD,

Met referentie naar uw verzoek om aanvullende informatie ontvangen op 10 augustus 2015 stuur ik u hierbij mijn antwoord op de vraag gesteld in uw schrijven.

**Vraag:**

In uw aanvraag worden de humane eindpunten als volgt beschreven:

- The animal does not drink or eat anymore
- Reduction of body weight greater than 20% compared to the initial weight
- More than moderate circulation and / or respiratory issues
- Behaviour and movements of the animal are more than moderately deviating from routine.

Het exacte punt waarop deze eindpunten bereikt worden is niet duidelijk gesteld in deze beschrijving. Bijvoorbeeld, hoe lang moet een dier niet meer eten/drinken alvorens men ingrijpt? Hoe wordt bepaald of een dier niet meer eet/drinkt, aangezien de dieren in groepen gehuisvest zijn? Wat betreft de afname in lichaamsgewicht moet genoemd worden dat cavia's na 6-8 weken nog doorgroeien en een afname van 20% van het initiële lichaamsgewicht is dus een drastische afname ten opzichte van het te verwachten gewicht in de loop van de studie.

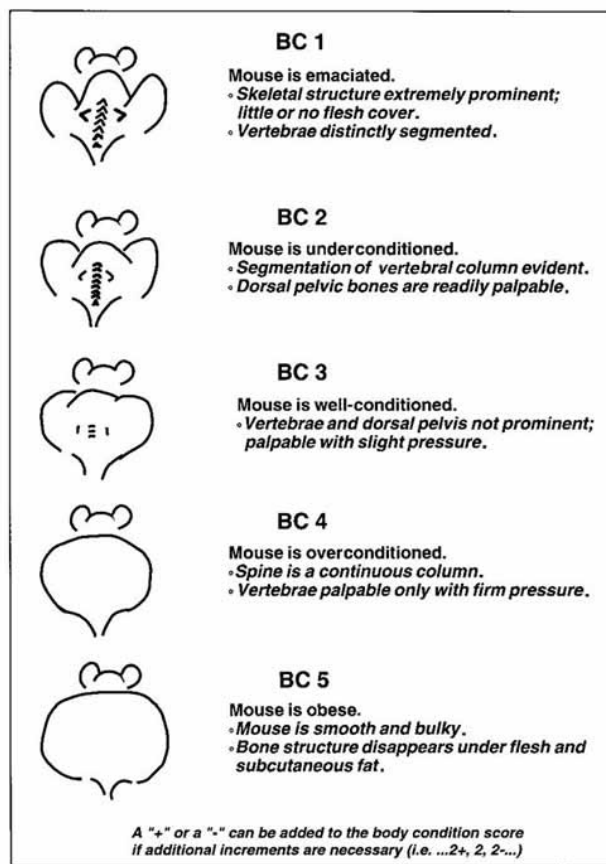
Ook het derde en vierde humane eindpunt geven niet een duidelijke interpretatie-vrije omschrijving van het eindpunt.

**Antwoord:**

We realiseren ons inderdaad dat de humane eindpunten zoals ze op dit moment omschreven zijn in het formulier "Description animal procedures" te veel ruimte openlaten voor vrije interpretatie. Bijgevoegd is een nieuwe versie van het formulier met daarin een aangepaste (punt 1 en 2, voor de duidelijkheid nu gecombineerd tot 1 punt) en voor de punten punt 3 en 4 een aangepaste omschrijving van deze humane eindpunten zodat op de werkvloer geen interpretatieverschillen kunnen optreden. De aangepaste tekst van 2J is hieronder afgedrukt. Tevens is het volgende kopje in het formulier enigszins aangepast (likelijkheid of symptoms).

In general, no abnormalities are expected during the study other than mild respiratory symptoms due to the RSV infection of group 9 as characterised by slightly elevated respiratory rate during the first two weeks after infection after which the respiratory rate should have normalised. If these respiratory symptoms aggravate, as characterized by labored breathing, the respective animal will be euthanised.

The following more general humane endpoints during the course of the study will be used to prevent further distress. The animals will be observed daily to assess the total body scores with respect to overall condition and the overall performance of the animals (see figure below). If the body condition scoring deviates from normal (BC3), this will be registered for the respective animal and this animal is monitored more frequently. Animals displaying a body condition score of 2 or lower in combination with one of the humane endpoint mentioned below will be euthanised.



- Reduction of body weight greater than 20% compared to normal body weight adjusted for age (see table below according supplier Harlan laboratories) animals are not expected to grow much more after 13 weeks of age:

Week 6	Week 7	Week 8	Week 9	Week 10	Week 11	Week 12	Week 13 and onwards
410	460	500	540	580	620	650	680

Animals are weighted every week. If the body weight stagnates or decreases slightly (<5%) in two consecutive weekly measurements, the animal is weighted more frequently. If the body weight continues to stagnate or decrease or if the body weight decreases between two measurements with 5-10% the animal is housed solitary to monitor the respective animal more closely with regards to food and water intake. The food intake is monitored by weighing back the food pellets and the water intake by checking the water level in the bottle. Furthermore the overall body score will be assessed including condition of the skin.

- More than moderate circulation issues as characterized by pale or cyanotic ears as an indication of poor blood circulation. Since RSV infection will not spread systemically in this model, these symptoms are not expected. If they do occur the colour of the ears is compared to a colour guide. The respiratory symptoms are described above.
- Behaviour and movements of the animal are more than moderately deviating from routine as characterized by excessive grooming, constant hiding, loss of balance, limping or hopping or ultimately lethargy as observed during daily checks as mentioned above.

Ik hoop u hiermede voldoende te hebben geïnformeerd om de beoordeling van dit projectvoorstel af te ronden.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED], [REDACTED]  
[REDACTED]

Viroclinics Biosciences B.V.  
Rotterdam Science Tower  
Marconistraat 16  
3028 AK Rotterdam  
Tel. [REDACTED]  
Mob. [REDACTED]



## Appendix

### Description animal procedures

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 90500
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. BioXpert
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 1             | RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

### 2 Description of animal procedures

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

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

The Sponsor of the study is aiming to develop a RSV vaccine for prevention of RSV infections in young children.

The study is performed to assess the in vivo immunogenicity in guinea pigs of a) a recombinant PRPM.CHO protein when used as a prime-boost immunization and b) an Adenovector driving expression of RSV F. The PRPM.CHO protein is produced in CHO cells and is a processed variant of the pre-fusion RSV-A2 F protein, containing quintuple (5) mutations.

The concrete objectives of the study are the following:

1. Immunogenicity of different doses of the PRPM.CHO RSV F derived protein in guinea pigs in a prime boost regimen, delivered with and without AdjuPhos.
2. Immunogenicity of an Ad35 vector containing the insert of the RSV F protein in guinea pigs.

The level of RSV neutralizing Ab titers as determined by VNA on serum samples collected at day 49, will be used as primary outcome parameter. The results will be used to determine the most optimal prime-boost regimen to assess transplacental transfer of RSV specific maternal antibodies to pups in future studies, which will be subject of another project proposal to be completed after conclusion of this study.

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

The study is designed to evaluate the immunogenicity of various doses of the PRPM.CHO protein with and without adjuvation with AdjuPhos (Brenntag Biosector, Frederikssund, Denmark), in a prime-boost regimen in guinea pigs. Increasing protein doses will be used (0.5, 5 and 25µg per vaccination; groups 1 to 3 and 4 to 6) to determine the immunogenicity. Groups with and without AdjuPhos will be used to



determine the immunostimulatory effect of a licensed adjuvant (AdjuPhos) for this protein vaccine preparation (groups 1 to 3 vs. groups 4 to 6). For adjuvation of antigen two different kinds of adjuvant can be used: negatively (e.g. AdjuPhos) or positively (e.g. Alhydrogel) charged. Choice of the adjuvant will depend on the charge of the antigen. In this case the antigen is positively charged, therefore the negatively charged AdjuPhos will be used. This adjuvant has been shown to be effective without the occurrence of adverse effects in several preclinical models, including mice, cattle, and macaques (de Swart, J. Virol, 2002; de Waal, Vaccine, 2004; Kateregga, BMC Vet Res, 2012). Moreover, to determine the immunogenicity of a high dose of Adenovector with an RSV F gene insert (Ad35.Fdcp) will be evaluated (group 8, prime only).

The animals will be vaccinated intramuscularly (i.m.) at day 0 (prime) and day 35 (boost) after which the immune response is studied for 42 days (6 weeks).

The maximum volume to be applied i.m. will not exceed 0.1 ml per injection site with a maximum of two injection sites/inoculation.

During the experiment blood will be collected from the animals at days 0 (pre vaccination), 28, 35, 49 and 63. Collection of blood (from the vena cava cranialis) and administration of prime and boost formulations will be performed under isoflurane anesthesia. The blood collection volumes will not exceed 8 ml/kg/28 days. On day 77 all animals are euthanized by exsanguination under isoflurane anesthesia, followed by a lethal sodium pentobarbital dose.

In the experiment two control groups are included in which the animals are either i.m. injected with PBS (day 0 and day 35, negative control, group 7), or primed at day 0 with a high dose ( $10^5$  PFU/animal) of RSV-A2 intranasally (positive control, induction of F protein specific immune responses in the context of a natural infection, group 9).

Groups and administration specifics are given below:

Group	Prime		Boost		n=	adjuvant	route
	Item	Dose	Item	Dose			
1	PRPM	0.5 µg	PRPM	0.5 µg	7	AdjuPhos	i.m.
2	PRPM	5 µg	PRPM	5 µg	7	AdjuPhos	i.m.
3	PRPM	25 µg	PRPM	25 µg	7	AdjuPhos	i.m.
4	PRPM	0.5 µg	PRPM	0.5 µg	7	-	i.m.
5	PRPM	5 µg	PRPM	5 µg	7	-	i.m.
6	PRPM	25 µg	PRPM	25 µg	7	-	i.m.
7	PBS	-	PBS	-	7	-	i.m.
8	Ad35.Fdcp	$10^{10}$ vp	-	-	7	-	i.m.
9	RSV-A2	$10^5$ pfu	-	-	7	-	i.n.

During the study the animals will be observed daily for general health checks, morbidity and mortality. Bodyweights will be determined at the start of the study, and once every week during the duration of the experiment.

Using the blood samples collected on the days mentioned above, the immunogenicity of the various formulations will be assessed by serological analysis in an RSV specific virus neutralization assay.

#### Data analysis

The primary aim of the experiment is to explore the dose response of the adjuvanted and non-adjuvanted PRPM.CHO, a recombinant RSV-A derived F protein, in guinea pigs. Furthermore, immunogenicity of an Ad35 vector containing the insert of the RSV F protein will be evaluated. As an exploratory analysis, the mean VNA titer (log<sub>2</sub>) and the standard deviation will be calculated for each group.

Immune responses on days 28, 35, 49, 63 and 77 will be evaluated by comparing VNA titers in Groups 1-6 and 8 with Group 7. Since it is expected that all animals of Group 7 will have Ab titers at the lower limit of quantification (LLOQ), a Wilcoxon Rank Sum test will be used for these comparisons and a Bonferroni correction for multiple testing will be applied. The consecutive serum samples will be used to

assess the kinetics of RSV neutralizing antibody development, i.e. sera obtained on days 63 and 77 will provide information on the longevity of the antibody response.

The effect of AdjuPhos on the immune responses will be determined by comparing Groups 1-3 with Groups 4-6 across doses. An analysis-of-variance for potentially censored measurements will be applied to the log<sub>2</sub>-transformed VNA titres. The statistical model contains dose and adjuvant (as defined in the group scheme above) as explanatory factors.

Gate keepers:

Group 7: serves as a negative control group for the experiment

Group 9: serves as a positive control group for the experiment

The level of RSV neutralizing Ab titers as determined by VNA on serum samples collected at day 49, will be used as primary outcome parameter.

The experiment will be considered valid if group 9 shows significantly higher RSV neutralizing Ab titers than Group 7 in serum collected at day 49 after immunization.

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

Power calculation.

Since this is the first study in which the effect of prime- boost immunization with PRPM-CHO protein (Groups 1-6) and with a prime immunization with Ad35.Fdcp (Group 8) is performed in guinea pigs, no exact power calculation for the size of the treatment or the control groups (Groups 7 and 9) can be performed. Data obtained in this study will be used for power calculations for future experiments. As an estimation, using a power analysis assuming continuous, normally distributed results, based on  $\alpha=0.05$ , power=0.8 and SD of 4 and a difference between groups of 6 (log<sub>2</sub> transformed VNA titers), the required group size is estimated to be 7 ( $N=2*(2.8*SD/(mean1-mean2)^2$ ).

## **B. The animals**

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

Species: Outbred SPF female guinea pigs (Dunkin Hartley strain). For justification of this animal model see refinement in D.

Origin: registered breeder.

Life stage: 6-8 weeks of age at the start of the study.

This part of the study will be performed with females, since the outcome of this study will be used to assess transplacental transfer of maternal antibodies to pups in future studies. The life stage is chosen since future studies will require the use of female guinea pigs that are capable to reproduce.

Estimated numbers: a maximum of 63 animals (9 groups of 7 animals).

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

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

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

Replacement: This study is designed to generate immunogenicity profiles of vaccine preparation that are to be used in future studies in which transplacental transfer of maternal antibodies will be assessed.

Therefore, the immunogenicity needs to be assessed in the same animal model, the guinea pig. There is no in vitro system available that allows immunogenicity assessment of vaccine preparations.

Refinement: the guinea pig was chosen as an animal model because the results of this study will be used

to design a future study in which the influence of maternally derived antibodies on the immunogenicity and efficacy of candidate RSV vaccines will be addressed, the ultimate goal of the Sponsor. Trans-placental transfer of maternal antibodies in guinea pigs is similar to that in humans (Borghesi, Open J. of Anim. Sciences, 2014). These features, including the guinea pig's reproductive characteristics and susceptibility to RSV (Buraphacheep, JID, 1997) makes this the model of choice to perform the study described in this proposal, and also limits the use to female animals only.

Reduction: statistical analysis provided in section A ensures maximum likelihood of significant results using a minimum number of animals.

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

1) The animals will be housed in groups, in specific cages that include enrichment assets. Throughout the study, the animals will be observed daily to assess their general health status. Sampling and administration procedures are performed by qualified personnel and under anaesthesia to minimize discomfort and stress.

2) The experiment will be performed under DM-I conditions, except for animals that receive Adenovector and/or RSV preparations, which will be housed under DM-II conditions after administration of these preparations. All procedures will be performed in DM-I or DM-II equipment/facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

Not applicable.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Sampling and administration procedures are performed by qualified personnel and under anaesthesia to minimize discomfort and stress.

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

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

In the animals that will be challenged with RSV, mild transient respiratory symptoms may be observed.

Explain why these effects may emerge.

Mild, transient respiratory symptoms may occur because of the RSV infection.

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

Throughout the study, the animals will be observed daily for their general health status. Animals will be weighed weekly, when there is an indication for weight loss, weighing will be done daily. Humane endpoints are defined.

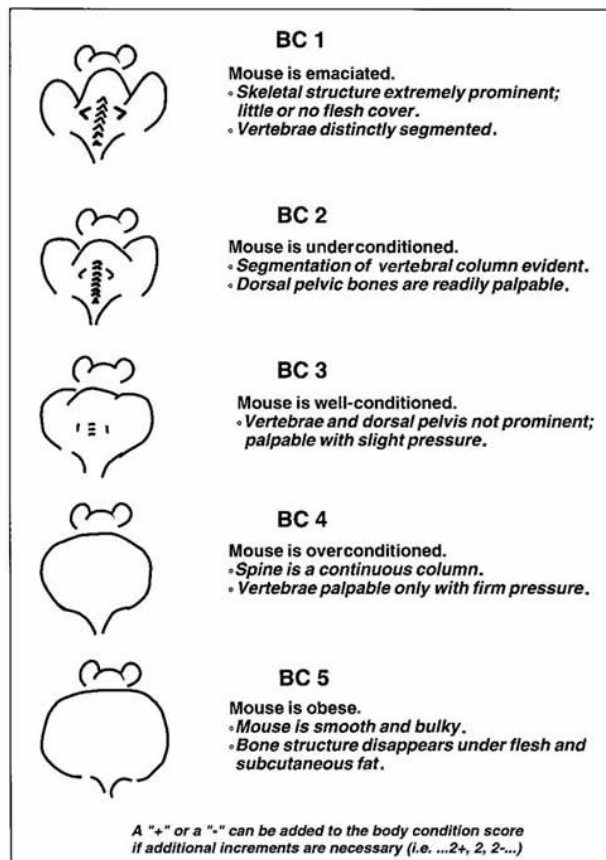
### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

In general, no abnormalities are expected during the study other than mild respiratory symptoms due to the RSV infection of group 9 as characterised by slightly elevated respiratory rate during the first two weeks after infection after which the respiratory rate should have normalised. If these respiratory symptoms aggravate, as characterized by labored breathing, the respective animal will be euthanised. The following more general humane endpoints during the course of the study will be used to prevent further distress. The animals will be observed daily to assess the total body scores with respect to overall condition and the overall performance of the animals (see figure below). If the body condition scoring deviates from normal (BC3), this will be registered for the respective animal and this animal is monitored more frequently. Animals displaying a body condition score of 2 or lower in combination with one of the humane endpoint mentioned below will be euthanised.



- Reduction of body weight greater than 20% compared to normal body weight adjusted for age (see table below according supplier Harlan Laboratories) animals are not expected to grow much more after 13 weeks of age:

Week 6	Week 7	Week 8	Week 9	Week 10	Week 11	Week 12	Week 13 and onwards
410	460	500	540	580	620	650	680

Animals are weighted every week. If the body weight stagnates or decreases slightly (<5%) in two consecutive weekly measurements, the animal is weighted more frequently. If the body weight continues to stagnate or decrease or if the body weight decreases between two measurements with 5-10% the animal is housed solitary to monitor the respective animal more closely with regards to food and water intake. The food intake is monitored by weighing back the food pellets and the water intake by checking the water level in the bottle. Furthermore the overall body score will be assessed including condition of the skin.

- More than moderate circulation issues as characterized by pale or cyanotic ears as an indication of poor blood circulation. Since RSV infection will not spread systemically in this model, these symptoms are not expected. If they do occur the colour of the ears is compared to a colour guide. The respiratory symptoms are described above.

Behaviour and movements of the animal are more than moderately deviating from routine as characterized by excessive grooming, constant hiding, loss of balance, limping or hopping or ultimately lethargy as observed during daily checks as mentioned above.

Indicate the likely incidence.

Not very likely as clinical symptoms arising because of RSV infection or the to be used preparations are uncommon and not considered lethal in this model.

**K. Classification of severity of procedures**

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

Sampling of blood under anaesthesia: mild

Sampling of blood and administration of immunogens under anaesthesia: mild

Symptoms due to infection with RSV: moderate

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

At the end of the study the animals will be euthanised as they will not be useful/suitable for other studies/purposes.

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

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

Yes



10.

Centrale Commissie Dierproeven i.o.

## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |             |            |   |
|----------------|-------------|------------|---|
| Naam aanvrager | BioXpert BV |            |   |
| Postcode       | 5374RE      | Huisnummer | 3 |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |                 |
|----------------|-----------------|
| Aanvraagnummer | AVD905002015154 |
|----------------|-----------------|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |   |
|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> brief onderzoeker met antwoorden    |
| <input checked="" type="checkbox"/> description animal procedures       |
| <input checked="" type="checkbox"/> begeleidende brief vergunninghouder |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |                |
|--------------|----------------|
| Naam         | [Redacted]     |
| Datum        | 14 - 08 - 2015 |
| Handtekening | [Redacted]     |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

**Centrale Commissie Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

**Ref nr:** Aanvraagnummer AVD905002015154  
**Betref:** Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven  
**Cc:** [REDACTED]

Schaijk, 14 augustus 2015

Geachte Commissie Dierproeven,

Op 10 augustus 2015 ontving ik uw verzoek om aanvullende informatie bij onze projektaanvraag "RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs" met aanvraagnummer AVD905002015154. In onze aanvraag zaten voor u nog enkele onduidelijkheden.

Ik heb de verantwoordelijk onderzoeker verzocht de gevraagde informatie helder en leesbaar aan te leveren. Deze informatie is door onze IvD beoordeeld en de IvD heeft mij geadviseerd de informatie naar u door te sturen, omdat zij van oordeel is dat nu passende en werkbare humane eindpunten zijn opgenomen zodat op de werkvloer geen interpretatieverschillen kunnen optreden.

De leges zijn per direct betaald, dat is door de vakantieperiode een ommissie van onze kant. Omdat de aanvraag echter al wel in behandeling is genomen, vraag ik coulance voor de doorlooptijd met het vriendelijk verzoek de gestelde termijn van 40 dagen vanaf indienen van de aanvraag op 18 juli te hanteren.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]  
Vergunninghouder BioXpert B.V.





## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3  
5374 RE Schaijk

### Centrale Commissie Dierproeven

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD905002015154

**Uw referentie**

### Bijlagen

1

Datum 14 augustus 2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 18 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs" met aanvraagnummer AVD905002015154. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 augustus 2015 heeft u uw aanvraag gewijzigd op basis van door de CCD gestelde vraag betreffende humane eindpunten.

### Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs" starten. De vergunning wordt afgegeven van 14 augustus 2015 tot en met 31 juli 2016.

### Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 juli 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie 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 liggen ten grondslag aan dit besluit.

### Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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


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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

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



**Datum**

14 augustus 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD905002015154

## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** BioXpert B.V.  
**Adres:** Nistelrooise Baan 3  
**Postcode en woonplaats:** 5374RE Schaijk  
**Deelnemersnummer:** 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 augustus 2015 tot en met 31 juli 2016, voor het project "RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs" met aanvraagnummer AVD905002015154, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 juli 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 juli 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 juli 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 18 juli 2015
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 augustus 2015.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
RSV-F protein and Adenoviral vaccine immunogenicity in guinea pigs	Cavia	63	56 dieren licht 7 dieren matig	-

### Voorwaarden

-

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Datum**  
14 augustus 2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD905002015154

of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

Uit artikel 13c 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 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.