





23 NOV. 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? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in [redacted] <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>[redacted]</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>[redacted]</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	[redacted]	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]	KvK-nummer	[redacted]									
Naam instelling of organisatie	[redacted]																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]																
KvK-nummer	[redacted]																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>[redacted]</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>[redacted]</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>[redacted]</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>[redacted]</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>[redacted]</td></tr></table>	Straat en huisnummer	[redacted]	Postbus	[redacted]	Postcode en plaats	[redacted]	IBAN	[redacted]	Tenaamstelling van het rekeningnummer	[redacted]					
Straat en huisnummer	[redacted]																
Postbus	[redacted]																
Postcode en plaats	[redacted]																
IBAN	[redacted]																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	[redacted]																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[redacted]		Afdeling	[redacted]		Telefoonnummer	[redacted]		E-mailadres	[redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[redacted]																
Afdeling	[redacted]																
Telefoonnummer	[redacted]																
E-mailadres	[redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[redacted]		Afdeling	[redacted]		Telefoonnummer	[redacted]		E-mailadres	[redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	[redacted]																
Afdeling	[redacted]																
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                     |            |                                                                       |
| Afdeling                    |            |                                                                       |
| Telefoonnummer              |            |                                                                       |
| E-mailadres                 |            |                                                                       |
- 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 | 0 1 _ 0 4 _ 2 0 1 6 |
| Einddatum  | 3 1 _ 0 3 _ 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Stability of a mucosal adjuvant and an intranasal RSV vaccine
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Stabiliteit van een mucosaal adjuvans en een intranasaal RSV vaccin
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| Naam DEC    | DEC-RUG                        |
| Postadres   | Postbus 196; 9700 AD Groningen |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl           |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

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

## 5 Checklist bijlagen

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

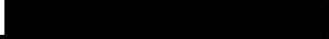
## 6 Ondertekening

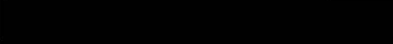
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

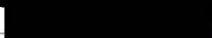
Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

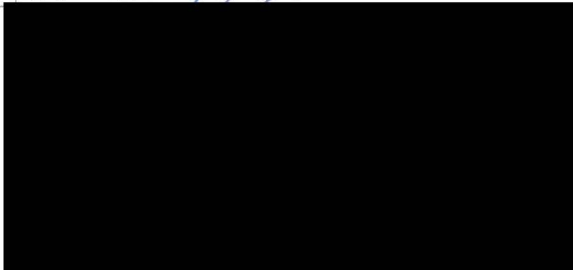
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Functie 

Plaats 

Datum 23 - 11 - 2015

Handtekening 



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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 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 animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

### 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.
- 

Vaccines are one of the most cost-effective medical interventions. Despite this fact, there are still many infectious disease indications for which an effective vaccine is lacking, only suboptimal protection is provided by the existing vaccines or existing vaccines provide insufficient protection in specific target groups. Therefore, the need for new or improved prophylactic vaccines to prevent infectious diseases urges further vaccine development.

Traditionally prophylactic vaccines against infectious diseases have been based on attenuated or inactivated forms of the pathogen. In order to reduce safety issues related to these type of vaccines, modern vaccine development focusses often on development of subunit vaccines. These type of vaccines often require a suitable adjuvant in order to raise the immunogenicity and efficacy of the vaccine.

Another aspect is that needle-free administration of vaccines may have advantages compared to the traditional intramuscular vaccines. It may be easier to implement new needle-free vaccines (e.g. nasally or orally administered) in the existing childhood vaccination programs, in which children sometimes already get two injected vaccines per consult. Also, vaccine acceptance may increase because of lower risks or stress. Moreover, mucosally administered vaccines may raise local immunity at the mucosae (which is not elicited by intramuscular vaccines) that can contribute to enhanced vaccine efficacy.

For the above mentioned challenges it is critical to develop effective subunit antigens that are combined with powerful, but safe adjuvants to make more effective and well-tolerated vaccines.

██████ developed a mucosal adjuvant that is based on particles of non-living bacteria. The particles are based on safe non-pathogenic Gram-positive bacteria such as the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis*. The particles, called bacterium-like particles (BLPs), are based on bacteria that do not contain endotoxins such as LPS and do not contain recombinant DNA. The non-living particles do not produce the vaccine antigen. The vaccine subunit antigen is obtained from another source (recombinantly produced or commercially acquired) and is combined with the BLP either in a mixing format in which there is no binding of the antigen to the BLP or in a bound format in which the antigen is attached to the BLP surface. The attachment of the antigen to the BLP surface is achieved by engineering a specific proteinaceous domain into the subunit antigen. This proteinaceous domain (an amino acid sequence originating from a Lactococcal protein) has high affinity for the surface of the BLP. In this way, antigens are bound in a non-chemical way to the BLPs. Binding is very stable and in this format the BLPs act as a carrier with intrinsic immunostimulatory properties.

The mode of action of BLPs in mice has been investigated (Keijzer et al. 2014. *Vaccine* 32:2904–2910) and it was shown that immune responses depend on the presence of Toll-like receptor 2 on cells of the innate immune system. Stimulation of the immune system through the innate immune system is required to obtain durable, long-lived responses through the adaptive immune system. It has also been shown that BLPs elicit balanced Th1/Th2-type responses (Saluja et al. 2010. *AAPS J.* 12:109-116), which reduces safety concerns associated with excessively Th2- or Th1-skewed immune responses.

██████ has used the BLP technology extensively, also in external collaborations for research on vaccines directed against Influenza virus, Hepatitis B virus, RSV, malaria, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Shigella* ssp and *Yersinia* ssp mostly in mouse models, but in a number of cases also in Wistar rat, cotton rat, ferret and rabbit models. In all cases, efficacy was shown without local and systemic side effects (Van Braeckel-Budimir et al. 2013. *Front. Immunol.* 4:282).

---

As part of a previous DEC-RUG basic project (in that DEC project the BLPs were described as Gram-positive enhancer matrix [GEM]) [REDACTED] conducted several vaccine experiments at the UMCG facilities, these included different subunit vaccine antigen formulations with and without adjuvant administered nasally or intramuscularly. The experiments were all in mouse models and focused on determining the immunological responses, locally and systemically, humoral and cellular. The experiments included identification of (i) immunologically relevant subunit antigens, (ii) the optimal vaccine formulation, (iii) the optimal route of administration, (iv) dose finding. Furthermore, the immunization experiments were used to determine/characterize (i) the mode of action of BLPs, (ii) the type of immune responses, (iii) the durability of responses, and were exploited to develop and use models to determine the potency of BLP batches and of RSV vaccine batches.

BLPs are produced by [REDACTED] on an R&D scale and by contract manufacturing organizations (CMOs) under Good Manufacturing Procedures (GMP) conditions for the production of clinical batches. A GMP BLP batch has been used as part of an intranasal Influenza vaccine formulation that was tested in a human Phase I trial in 2010-2011. The vaccine was well tolerated in humans (no reactogenicity and/or tolerability issues compared to placebo) and induced both local and systemic Influenza-specific immune responses (Van Braeckel-Budimir et al. 2013. Front. Immunol. 4:282).

The production of different BLP batches requires monitoring of the quality of the material which includes currently an in vivo potency test (intranasal immunizations of mice). In vivo potency tests are often required in early stages of vaccine development. During the past years [REDACTED] has been working on a cell-based assay as replacement for the BLP in vivo potency test, however, a reliable correlation between potency in the cell-based assay and the in vivo potency assay could not be determined yet. Hence, the in vivo potency test for BLPs still remains necessary for a reliable determination of the potency of BLP batches.

Despite the fact that [REDACTED] developed [REDACTED]

In addition, for the GMP grade clinical trial material it is a regulatory requirement to monitor the stability of the material at least during the clinical trials. The stability tests include monitoring the in vivo potency over time. Currently, [REDACTED] has two clinical BLP batches in a formal stability study, already running for almost 1 year. As part of these studies, BLP in vivo potencies assays have been performed at T=0 and 6 months (under an approved DEC that is now expiring). In order to complete these stability studies, BLP mouse potency studies are required at T=12, 18, 24, 36 and 48 months. At these timepoints we will include R&D batches obtained through modified production processes that aim to improve the production process.

In addition to the above described BLP stability program, [REDACTED] works on the development of the BLP-based intranasal RSV vaccine SynGEM. RSV (the human respiratory syncytial virus) is a major cause of seasonal epidemics of severe lower respiratory tract disease. Worldwide, an estimated 64 million RSV infections occur annually, resulting in the death of approximately 250,000 individuals (Status of RSV Vaccine R&D, WHO 2014). In the 7 major pharmaceutical markets the total annual number of hospitalizations due to RSV infections is estimated to be 900,000. While RSV attacks all age groups, the most severe disease occurs in (i) the elderly, (ii) patients with chronic lung disease, (iii) persons with impaired immunity, and (iv) very young infants (under 2 years of age). Indeed, RSV is the most important cause of viral lower respiratory tract illness (LRI) in infants and children worldwide. The current treatment is limited to application of supplemental oxygen and mechanical ventilation. The availability of pharmacotherapy is limited and the only prophylacted treatment with the neutralizing mAb Palivizumab is very costly (+/- 6,000 Euro per treatment) and therefore limited to the use in premature infants in certain high income countries. Despite the clear medical need, no licensed prophylactic vaccine is available to date. [REDACTED] developed [REDACTED]

[REDACTED] At present, this existing vaccine program is lined up to enter the clinic in 2016. Also for the SynGEM program stability studies are planned for the clinical batches. These stability studies include the monitoring of the in vivo potency using a mouse model. This SynGEM mouse potency model was set up in house under an approved DEC which is currently expiring. Therefore, this application includes the stability testing using the SynGEM mouse potency model at T=0, 6, 12, 18, 24, 36 and 48 months. [REDACTED]

### 3.2 Purpose

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

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

The project's objective is monitoring the stability of batches of BLPs and the intranasal RSV vaccine SynGEM by determining the in vivo potency in mice models. The research questions that need to be answered are:

- what is the in vivo potency of a given BLP batch and does it remain its potency over time?
- what is the in vivo potency of a given SynGEM batch and does it remain its potency over time?

The BLP and SynGEM mouse potency assays are both existing models that were developed under an existing DEC. Both models were set up to discriminate between 'good' and 'bad' batches. For both models a reference batch (100% potency) has been laid down that is used as 'good' batch throughout the entire study. ████████ developed both models. Moreover, ████████ personnel are highly trained and knowledgeable for these type of vaccination experiments with respect to animal handling, vaccine administration, sampling and termination.

### 3.3 Relevance

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

The objectives described above fit in the overall aim of ████████ to develop a reliable and safe BLP adjuvant for the development of new types of subunit vaccines to prevent infectious diseases in general and the intranasal RSV vaccine SynGEM in particular. The BLP adjuvant may enable the development of vaccines that are administered through a non-invasive route (e.g. nasal spray or oral capsules), which may enhance compliance and therefore may have a positive effect on the participation of individuals in vaccination programs. A new RSV vaccine will help to reduce the disease burden in young children and elderly. Overall, the development of BLP-based mucosal subunit vaccines and the intranasal SynGEM in particular target to develop products that will minimize doctor visits, hospitalizations and medications, hence it will reduce overall healthcare costs.

### 3.4 Research strategy

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

The research strategy for the existing intranasal RSV vaccine (SynGEM) and BLP stability program is limited to testing and monitoring vaccine potency using the existing in vivo mice potency models. Each stability program of the SynGEM and BLP experimental products that are tested in the clinic, includes storage of the products at two temperatures (T1 and T2). T1 ('desired temperature') is the storage temperature for which (limited) stability data is available, but which gives at present most certainty the product will be stable for a reasonable time. T2 is a higher storage temperature ('elevated temperature') which enables to obtain a better understanding of the product stability in a shorter time.

In the mouse potency models, clinical BLP and SynGEM batches are compared with a reference batch ('good batch') to monitor the potency level of the test batches in time. The reference BLP or SynGEM batch is the same in each experiment (the reference batches are stored at -80 degrees Celsius). In each experiment, the subunit antigen is given intramuscularly without adjuvant to check the immunogenicity of the antigen (positive control). A maximum of two additional R&D BLP or SynGEM batches will be combined with each timepoint experiment in order to reduce the number of experiments and thereby reducing the number of animals needed (saves on the number of reference and positive control groups). The reference and test groups will be given the



vaccine by the intranasal route. The potency will be determined by measuring the level of antigen-specific total serum IgG levels and compare the means of the test groups with the mean of the reference group.

---

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

The basic outline of the in vivo BLP potency mouse test:

- BLP batches to be tested and the reference batch are mixed in a standard ratio with hemagglutination (HA) antigen of influenza (used as the standard antigen and the same in all time points). The reason that the mixed mode is used is for historic reasons. The BLP potency assay was developed as part of the development of an intranasal Influenza vaccine in which the BLPs were mixed with HA. This intranasal BLP-based Influenza vaccine has also been used in a clinical Phase I trial;

- Mice are intranasally vaccinated three times with the BLP test batches and reference batch. A group that receives HA antigen without adjuvant intramuscularly is taken along as positive control;

- After full vaccination terminal sera is collected to determine antigen-specific serum antibody levels.

Since 2 clinical BLP batches are currently in a stability program in which each batch is stored at two different temperatures (T1 = the desired temperature, T2 = an elevated temperature), each timepoint will comprise of 4 clinical test batches, the reference batch and a positive control for the antigen. The running BLP stability program has the following timepoints for which a determination of the in vivo potency is included: T=12, 18, 24, 36 and 48 months (T=0 and T=6 have already been conducted). A maximum of 2 R&D BLP batches will be taken along to measure the potency of new R&D batches.

The basic outline of the in vivo SynGEM potency mouse test:

- The SynGEM batches to be tested and the reference batch contain a similar level of bound RSV F subunit antigen. The reason the antigen is bound to the BLP in this potency assay is because this is the format that will be used in the intended SynGEM clinical trials;

- Mice are intranasally vaccinated two times with the SynGEM test batches and reference batch. A group that receives F antigen without adjuvant intramuscularly is taken along as positive control;

- After full vaccination terminal sera is collected to determine antigen-specific serum antibody levels.

Since 2 clinical SynGEM batches are currently being produced and will be included in a stability program in which each batch is stored at two different temperatures (T1 = the desired temperature, T2 = an elevated temperature), each timepoint will comprise of 4 clinical test batches, the reference batch and a positive control for the antigen. The SynGEM stability program has the following timepoints for which a determination of the in vivo potency is included: T=0, 6, 12, 18, 24, 36 and 48 months. A maximum of 2 R&D SynGEM batches will be taken along to measure the potency of new R&D batches.

The stability study for a SynGEM batch that drops in potency below the level of 30% compared to the reference batch will be terminated. An R&D SynGEM batch that has a potency lower than 30% compared to the reference batch is considered to be unsuitable for further preclinical testing.

The animal procedures that will be used in all the above described experiments will be intranasal administration of vaccines in mice as described in Appendix 1.

---

#### 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.

[REDACTED]. The testing of the R&D BLP batches drives the further development of the BLP production process.

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	Vaccination test procedure
2	
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Stabiliteit van een mucosaal adjuvans en een intranasaal RSV vaccin
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | vaccinatie, slijmvliezen, adjuvans, RSV vaccin

## 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*

### 3 Projectbeschrijving

- |                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | De doelstelling van het project is om de sterkte van een mucosaal adjuvans (een adjuvans dat via de slijmvliezen z'n werking heeft) en van een intranasaal respiratoir syncytial virus (RSV) vaccin in de tijd te monitoren. Beiden maken onderdeel uit van, enerzijds de ontwikkeling van een mucosaal adjuvans dat gebruikt kan worden voor het ontwikkelen van vaccins tegen infectieziekten en anderzijds de ontwikkeling van een speciek RSV vaccin dat gebaseerd is op dit mucosale adjuvans en dat via de neus toegediend wordt. Het mucosale adjuvans is gebaseerd op onderdelen van veilige melkzuurbacterien (bacterien die doorgaans gebruikt worden bij het maken van kaas). De vaccins gemaakt op basis van dit mucosale adjuvans bevatten geen recombinant DNA. Om de sterkte van de immuun respons die opgewekt kan worden met het mucosale adjuvans te meten wordt het adjuvans gecombineerd met een eiwit, en na intranasale vaccinatie worden de antistoffen in het bloed tegen dit eiwit bepaald. Om de stabiliteit van dit adjuvans te bepalen wordt deze proef in de loop van de opslag periode herhaald. In het kandidaat RSV vaccine is het mucosale adjuvans gecombineerd met 1 eiwit van het RSV virus. Het vaccin zelf bevat dus geen ziekteverwekker en is dus zeer veilig. Omdat het kandidaat RSV vaccin geproduceerd is om in een klinisch traject in de mens gestest te gaan worden, moet de stabiliteit van het vaccin in dieren bepaald worden om te kunnen garanderen dat het kandidaat RSV vaccin gedurende de looptijd van de klinische fasen (meerjarig project) dezelfde sterkte behoud. Een RSV vaccin is van belang omdat er op dit moment nog geen vaccin beschikbaar is tegen ziekte veroorzaakt door RSV. Wereldwijd is de omvang van ziekte veroorzaakt door RSV vergelijkbaar met dat voor Influenza, en met name in jonge kinderen en ouderen kan RSV ziekte zeer ernstig en levensbedreigend zijn. De ontwikkeling van een RSV vaccin wordt dan ook door de WHO als een prioriteit aangemerkt. |
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?         | De verwachting is dat dit project bijdraagt aan de ontwikkeling van nieuwe vaccins tegen infectieziekten die op een patient vriendelijke manier toegediend kunnen worden, nl. via de slijmvliezen zoals in de neus. De stabiliteit van het mucosale adjuvans is van belang voor de toekomstige ontwikkeling van nieuwe vaccins. De stabiliteit van het intranasale RSV vaccin is van belang voor de huidige klinische ontwikkeling van dit kandidaat vaccin. Het project draagt op die manier bij aan de ontwikkeling van een vaccin tegen een ziekte waar nu nog geen vaccin voor op de markt is. Het is de verwachting dat het intranasale RSV vaccin zal bijdragen aan een betere gezondheidszorg omdat bepaalde ziekten, zoals RSV die dodelijk kunnen zijn in jonge kinderen en ouderen of die gepaard gaan met of leiden tot ernstige ademhalings problemen, bronchitis, oorontstekingen en asthma voorkomen kunnen worden. De verwachting is ook dat de ontwikkeling van het mucosale adjuvans zal leiden tot nieuwe types vaccins die toegediend kunnen worden via de neus of mond en dat dit zal leiden tot minder weerstand tegen vaccinatie.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?                                                                          | Alle experimenten in dit project zullen uitgevoerd worden met muizen. Over een periode van 5 jaar zullen ongeveer 1300 muizen nodig zijn.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?                                             | De immunizaties worden uitgevoerd terwijl de dieren licht verdoofd zijn d.m.v een inhalatie verdoving. Dit wordt gedaan om de stress bij de dieren tijdens de toediening van vaccins, bloedafname en het wegen van dieren te voorkomen. De dieren ervaren geen pijn voor, tijdens of na de handelingen. Het in slaap brengen van de dieren en het ontwaken kan enige lichte stress veroorzaken. Aan het eind van de proef worden de dieren onder verdoving op een humane manier gedood.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het                                                                                                          | De dierproeven worden op basis van verwachte ernst ingedeeld als mild.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

project ingedeeld naar de verwachte ernst?

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden aan het eind van de proef gedood.

## 4 Drie V's

### 4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Het opwekken van een immuunrespons is een complex samenspel van organen en cellen die zich op verschillen plekken in het lichaam bevinden, en is niet na te bootsen in simpele op cellen gebaseerde experimenten. Dergelijke op cellen gebaseerde experimenten worden wel gebruikt om bepaalde reacties op vaccins te meten, maar testen in een diersysteem is nog nodig om het eindresultaat van al die effecten op de immuunrespons te kunnen meten.

### 4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Voor alle typen van experimenten die we uitvoeren plegen we overleg met een biostatistiek deskundige om het minimum aantal dieren te bepalen die nodig zijn om significantie van de resultaten aan te tonen. Verder proberen we daar waar mogelijk verschillende typen experimenten te combineren, dus verschillende vraagstellingen binnen 1 experiment te beantwoorden, om het aantal experimentele groepen te minimaliseren.

### 4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersysteem(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Voor de karakterisatie van de immuunrespons zijn voor muizen de meeste reagentia beschikbaar. Dus om de projectdoelstellingen te kunnen halen zijn muizen de beste keuze.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

De dieren worden gehuisvest in kleine groepen (max 8) in doorzichtige bakken met voldoende voedsel, water, bodembedekking, nest en speel materiaal, in een geconditioneerde ruimte met dag- en nacht ritme. Overdag is in de huisvestingruimte (zachte) muziek te horen zodat schrik-effecten bij de dieren geminimaliseerd worden wanneer mensen de ruimte betreden. De toegepaste inhalatie verdoving veroorzaakt bij de dieren enige desorientatie bij het in slaap brengen en bij het ontwaken. De hoeveelheid verdoving is zodanig afgesteld dat deze heel licht is, wanneer de inhalatie van het verdovingsmiddel wordt gestopt, ontwaken de dieren binnen enkele minuten. Mochten de dieren tijdens een proef onverwachts lijken te lijden, dan zullen de dieren op humane wijze worden gedood.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

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

██████████

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

██████████

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Vaccination test procedure

*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 general design of the animal procedures using female mice:

- a) blood collection prior to each vaccine administration. The maximum allowed volumes per gram body weight will be used;
- b) intranasal vaccine administration of the test batches and intramuscular administration of the antigen alone (positive control);

- c) termination of the animals;
- d) collection of final serum.

The serum samples are used to determine the levels of antigen-specific serum antibodies by ELISA. This is commonly used as a biomarker for vaccine efficacy.

This general design is being used for the BLP as well as for the intranasal RSV vaccine SynGEM potency tests. Both potency tests have been developed and have been used in the past to discriminate between 'good' and 'bad' batches.

---

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

For the BLP potency assay the animal procedures are:

- [redacted] vaccinations in the test and reference groups, and [redacted] vaccinations in the positive control group (separate group). [redacted]
- [redacted]

For the SynGEM potency assay the animal procedures are:

- [redacted] vaccinations in the test and reference groups, and [redacted] vaccinations in the positive control group (separate group). [redacted]
- [redacted]

For both protocols, at each vaccination time point, body weight measurements and blood withdrawal will be done. Body weight measurements will be done in any case once a week, if not combined with vaccination, without the use of anaesthesia. Vaccines will be given under general inhalation anaesthesia. Volumes for intranasal and intramuscular vaccine administration will be up to the maximum indicated in the guidelines. Blood withdrawal will be combined with vaccine administration and will be done from the submandibular vein up to the maximum volume allowed per gram body weight. Repetitive blood sampling (n+1 as described above) will enable us to follow the kinetics of immune responses. At the end of the experiment, blood will be collected via cardiac puncture under general inhalation anaesthesia and animals will be terminated via cervical dislocation.

Both protocols were developed to provide the most optimal results in terms of serological read out.

---

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

ANOVA-tests for trends have been used to test the hypothesis of equal means against the two-sided alternative. For the group size determination a power of 80% with an alpha of 5% and an anticipated difference of a factor 2 and an SD of a factor 4 is taken into account.

---

## B. The animals



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

Inbred female SPF mice like BALB/c are used for these experiments. Female mice have been used to set up both potency models, therefore we are restricted to the use of female mice. Female mice are usually less aggressive which makes housing in groups easier and it also allows for monitoring the mucosal antibody response in a non-invasive manner at a distant site from nasal if needed. The BALB/c strains are commonly used in vaccine research and [REDACTED] has a lot of experience in using these animals in the BLP and SynGEM potency models. The animals will be purchased from suitable commercial vendors such as Harlan, Jackson, Charles River or equivalent. Animals of 6-8 weeks old will be purchased in order to have young adult mice with a mature immune system at the study start.

For the BLP potency assay a group [REDACTED] for the test batches and reference batch was determined to be needed in order to meet the statistical requirements. The positive control group consists [REDACTED] since these are not required for the statistical evaluation. [REDACTED]

The following numbers were used to calculate the overall number of mice needed for the BLP stability study:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

For the SynGEM potency assay a group [REDACTED] for the test batches and reference batch was determined to be needed in order to meet the statistical requirements. The positive control group consists [REDACTED] since these are not required for the statistical evaluation. [REDACTED]

The following numbers were used to calculate the overall number of mice needed for the BLP stability study:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

The total number of mice needed for the BLP and SynGEM potency experiments is [REDACTED]. We request a number of mice as a reserve in case of unforeseen calamities such as a mix up of vaccine batches or contamination of vaccines or mice. For this purpose we calculated 1 repetition of a potency assay with two test groups ([REDACTED]), a reference group ([REDACTED]) and a positive control group ([REDACTED]), which totals to [REDACTED].

The overall number of mice requested therefore totals to [REDACTED]

### 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: we are working on a TLR2-specific cell-based assay to determine the potency of BLPs, but at this moment there is not yet a reliable correlation between the in vivo potency of BLPs and the in vitro potency. Nevertheless, we keep improving this assays and/or exploring additional in vitro assays to replace the BLP in vivo potency assay. Also for the intranasal SynGEM vaccine, we are trying to develop an in vitro ELISA based assay. It is our goal to prevent use of in vivo potency assays or replace them as soon as possible with in vitro potency assays. However, in early stages of vaccine development in vivo potency assay can usually not be avoided.

- Reduction: by aligning the testing of R&D BLP and SynGEM batches with the stability testing we minimize the number of experiments and the number of animals because it reduces the use of reference and positive control groups. Furthermore, statistical methods were used to determine the optimal number of animals per group to obtain significant results. In that way, unnecessary repetition of experiments can be avoided and reduces the number of animals to achieve the research goals.

- Refinement: by combining treatments, e.g. blood withdrawal, vaccine administration and bodyweight measuring during one anaesthesia session per animal, the time and frequency the animals will experience stress will be limited.

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

- 1). By combining treatments (e.g. blood withdrawal, vaccine administration, bodyweight measuring) the total time and frequency of the animal procedure is minimized. By using inhalation anaesthesia stress as a result of the handlings is avoided and pain and suffering at termination is prevented. Only qualified personnel highly experienced in the applied animal procedure will be involved in the execution of the experiments in order to minimize stress for the animals.
- 2). No adverse effects on the environment since the animals are housed in a closed facility.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

The stability of the BLPs and the SynGEM vaccine is monitored in time to guarantee that optimal material is used during the clinical trials. Multiple R&D batches of BLPs need to be tested in order to further optimize the BLP production process and multiple R&D SynGEM batches need to be tested in order to guarantee optimal performance of R&D batches in other (more costly) preclinical animal models.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

BLP-based vaccines have been used in various animal models. In all models the BLP mucosal adjuvant was very well tolerated without adverse effects. Blood withdrawal from the submandibular vein to the maximum allowable volume per g body weight is well tolerated without adverse effects. The animals may experience minimal discomfort during application of general inhalation anaesthesia and waking up and/or shortly after vaccine administration and/or

blood sampling.

Explain why these effects may emerge.

Minimal discomfort during vaccine application, shortly after vaccine application and blood sampling may be experienced by the animals as a result of stress in the form of stress as a result of undergoing or recovering from the general inhalation anaesthesia.

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

Procedures for vaccine administration and blood sampling will be combined as much as possible. In addition, the length of the procedures will be minimized as much as possible and the number of animals present in the experimental operations room will be minimized in order to maximally reduce exposure to stress signals from other animals. Inhalation anaesthesia is used to minimize stress and pain as a result of blood sampling or vaccine administration. Body weight will be monitored during the experimental period to identify animals with health problems.

#### **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.

[REDACTED]. In case of a severe anaphylactic reaction to the vaccine the animals will be terminated. In addition, lethargy, immobility, ruffled fur, hunchback, tumors and severe scratching will be used as humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

BLP-based vaccines are very well tolerated by mice. [REDACTED]

[REDACTED] So far, anaphylactic reactions to the administered vaccines were never observed.

#### **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').

The expected levels of discomfort during and shortly after vaccine administration are mild. The last step in the procedure is termination of the animals under anaesthesia.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Termination of the mice is required to collect maximum volumes of final serum.

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

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Interne RuG code **8035**)
2. Titel van het project: **Stability of a mucosal adjuvant and an intranasal RSV vaccine.**
3. Titel van de NTS: **Stabiliteit van een mucosaal adjuvans en een intranasaal RSV vaccin.**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
  - naam: DEC-RUG
  - telefoonnummer contactpersoon:   

  - mailadres contactpersoon: 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **08-10-2015**
  - aanvraag compleet: **08-10-2015**
  - in vergadering besproken: **15-10-2015**
  - anderszins behandeld: **06-11-2015**
  - termijnonderbreking(en) van / tot: **16-10-2015 tot 05-11-2015**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - aanpassing aanvraag: **05-11-2015**
  - advies aan CCD: **18-11-2015**
7. Eventueel horen van aanvrager : **n.v.t.**
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden

- Aanwezige (namens) aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen
- Strekking van het (de) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **16-10-2015**
- Strekking van de vraag / vragen:

- **Vragen t.a.v. projectaanvraag:**

- Bij 2. Categories: [redacted]

- Onder 3.4.1. [redacted]

- **Vragen t.a.v. bijlage 1:**

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]

Is dit correct?

- Datum antwoord: **05-11-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn aangebracht en verwerkt in de project beschrijving en bijlages**

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

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

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) **Ja**.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag. **Ja**.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren. **Ja**.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering. **NVT**.

## C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
  - **Uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en). **Ja**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als **reëel**.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. **Ja**.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën 11, 13 en 13c3 van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
7. Er zijn voornamelijk geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**, maar zoals in de aanvraag aangegeven is al veel werk verzet teneinde te komen tot een goed gevalideerde *in vitro* test.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven, zoals geïllustreerd middels de omvang van de positieve controlegroep. Het maximale aantal te gebruiken dieren lijkt realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij dit wettelijk vereiste onderzoek, te voorkomen dat



onnodige duplicatie plaatsvindt.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd ondermeer gezien de toepassing van anesthesie bij vaccintoediening. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. **Ja**

## D. Ethische afweging

RSV-infectie is een virusziekte die morbiditeit en mortaliteit kan induceren bij jonge kinderen, ouderen, longpatiënten en mensen met een onvolledige afweer. Er bestaat geen specifieke therapie tegen deze infectieziekte. Het onderhavige onderzoek heeft als doel de preventie van RSV-infectie middels vaccinatie te verbeteren door gebruik van bacterium-like particles, die worden gehecht aan een subunit vaccin. De voorgestelde dierproeven dragen bij tot het bereiken van het hoofddoel van de aanvraag, namelijk te komen tot optimalisatie van het vaccin mede op basis van monitoring van de vigerende potentie van in klinisch onderzoek gebruikte batches. Het geheel vormt daarmee een toetsbare eenheid.

Per dierproef zijn de aantallen benodigde dieren inzichtelijk onderbouwd, waarbij goede aandacht is voor potentieel *in vitro* onderzoek alsmede voor duidelijk omschreven go/no go momenten [REDACTED] teneinde de vermindering en vervanging te optimaliseren. De onderzoeksgroep is bij uitstek gekwalificeerd voor het uitvoeren van dit onderzoek en beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van muizen en het daarbij beschreven ongerief. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Daarnaast is er het maatschappelijk belang: op termijn kan het project mogelijk voordelen opleveren voor de behandeling van RSV-infectie bij de mens en

daarmee hopelijk soelaas bieden voor patiënten, die vooralsnog onbehandelbaar zijn.

Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten komt de DEC-RuG tot de conclusie dat dit onderzoek ethisch toelaatbaar en toetsbaar is, derhalve adviseert de DEC-RuG tot vergunningverlening.

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD
  - **De DEC adviseert de vergunning te verlenen**
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD [redacted] 2015328  
**Bijlagen**  
2

Datum 26 november 2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]  
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 november 2015.  
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD [redacted] 2015328. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

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

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

#### **Factuur**

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

#### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: [REDACTED]  
Naam instelling of organisatie: [REDACTED]  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: [REDACTED]  
Straat en huisnummer: [REDACTED]  
Postcode en plaats: [REDACTED]  
IBAN: [REDACTED]  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
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 april 2016  
Geplande einddatum: 31 maart 2021  
Titel project: Stability of a muscosal adjuvant and an intranasal RSV Vaccine  
Titel niet-technische samenvatting: Stabiliteit van een mucosaal adjuvans en een intranasaal RSV vaccin  
Naam DEC: DEC-RUG  
Postadres DEC: Postbus 196, 9700 AD Groningen  
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

**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:   
Plaats:   
Datum: 23 november 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD [redacted] 2015328  
**Bijlagen**  
2

Datum 26 november 2015  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 26 november 2015  
Vervaldatum: 26 december 2015  
Factuurnummer: 15700328

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD [redacted] 2015328	€ 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD [redacted] 2015328

**13 JAN. 2016**

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 23 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Stability of a muscosal adjuvant and an intranasal RSV vaccine" met aanvraagnummer AVD [redacted] 2015328. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 januari 2016 heeft u op ons verzoek een aangepaste NTS ingediend.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Stability of a muscosal adjuvant and an intranasal RSV Vaccine" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 april 2016 tot en met 31 maart 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 november 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, met toevoeging van een algemene voorwaarde. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

#### **Bezwaar**

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven,



afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
namens de z.g.



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

## Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: [REDACTED]

Adres: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED]

Deelnemersnummer: [REDACTED]

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 april 2016 tot en met 31 maart 2021, voor het project "Stability of a mucosal adjuvant and an intranasal RSV vaccine" met aanvraagnummer AVD [REDACTED] 2015328, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG .

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 november 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 november 2015;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 januari 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 18 november 2015, ontvangen op 25 november 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Vaccination test procedure	Muizen (Mus musculus) / inbred, vrouwen	1317	Licht / mild	

### Voorwaarden

#### Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

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

**CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.**

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

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

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

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

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

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

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

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

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