

|            |                                       |                        |             |               |              |                          |               |               |             |
|------------|---------------------------------------|------------------------|-------------|---------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------|-------------|
|            | <b>Inventaris Wob-verzoek W16-13S</b> |                        |             |               |              |                          |               |               |             |
|            |                                       |                        |             |               |              |                          |               |               |             |
|            |                                       | <b>wordt verstrekt</b> |             |               |              | <b>weigeringsgronden</b> |               |               |             |
| <b>nr.</b> | <b>document</b>                       | <b>reeds openbaar</b>  | <b>niet</b> | <b>geheel</b> | <b>deels</b> | <b>10.1.c</b>            | <b>10.2.e</b> | <b>10.2.g</b> | <b>11.1</b> |
|            | <b>NTS2016454</b>                     |                        |             |               |              |                          |               |               |             |
| 1          | Aanvraagformulier                     |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |
| 2          | Projectvoorstel                       |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |
| 3          | Niet-technische samenvatting          | x                      |             |               |              |                          |               |               |             |
| 4          | Bijlage beschrijving dierproeven      |                        |             | x             |              |                          |               |               |             |
| 5          | DEC-advies                            |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |
| 6          | Ontvangstbevestiging                  |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |
| 7          | Advies CCD                            |                        | x           |               |              |                          |               |               | x           |
| 8          | Beschikking en vergunning             |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |
| 9          | Mail terugkoppeling DEC 29-4-2016     |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |



## 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?<br><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 10300<br><input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| 1.2                                                 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.                                                                                 | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>                                                                                            | Naam instelling of organisatie | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen                                       | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted]              | KvK-nummer         | 4 1 0 5 5 6 2 9 |                |                    |                                       |                |
| Naam instelling of organisatie                      | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted]                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| KvK-nummer                                          | 4 1 0 5 5 6 2 9                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| 1.3                                                 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein 10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101, t.a.v. [Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>             | Straat en huisnummer           | Geert Groteplein 10                                                              | Postbus                                             | 9101, t.a.v. [Redacted] | Postcode en plaats | 6500HB Nijmegen | IBAN           | NL90ABNA0231209983 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | UMC St Radboud |
| Straat en huisnummer                                | Geert Groteplein 10                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| Postbus                                             | 9101, t.a.v. [Redacted]                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| Postcode en plaats                                  | 6500HB Nijmegen                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| IBAN                                                | NL90ABNA0231209983                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer               | UMC St Radboud                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| 1.4                                                 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.                                                                                                                  | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[Redacted]</td> </tr> </table> | (Titel) Naam en voorletters    | [Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. | Functie                                             | [Redacted]              | Afdeling           | [Redacted]      | Telefoonnummer | [Redacted]         | E-mailadres                           | [Redacted]     |
| (Titel) Naam en voorletters                         | [Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| Functie                                             | [Redacted]                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| Afdeling                                            | [Redacted]                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| Telefoonnummer                                      | [Redacted]                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| E-mailadres                                         | [Redacted]                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                |                                                                                  |                                                     |                         |                    |                 |                |                    |                                       |                |
| 1.5                                                 | (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.                                                                               | <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[Redacted]</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  
Functie  
Afdeling  
Telefoonnummer  
E-mailadres

☐ Dhr. ☐ Mw.

- 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 07\_04\_2016  
Einddatum 07\_04\_2021

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën tegen pneumokokken infecties

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC RU DEC  
Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen  
E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,00 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-advies, factuurinformatie

## 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:

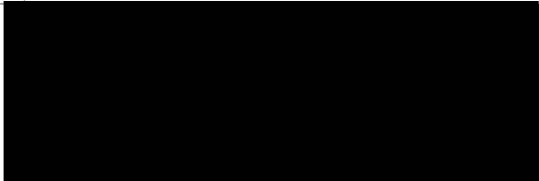
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Datum 07 - 03 - 2016

Handtekening 



### Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website([www.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'. | 10300                                                          |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.                                              | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen                     |
| 1.3 | Provide the title of the project.                                                            | Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections |

## 2 Categories

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

---

☐ Forensic enquiries

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

---

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

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

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

#### **The burden of respiratory infections by *Streptococcus pneumoniae***

The global burden of respiratory infections caused by the bacterium *Streptococcus pneumoniae* (the pneumococcus), is still high despite the availability of antimicrobiological agents and childhood vaccines. The pneumococcus kills approximately 500,000 children less than five years of age each year, mainly in the developing world (Source: World Health Organization). It is the leading cause of childhood pneumonia, the number one killer of children under five in the developing world. Pneumococcal disease can be treated with antibiotics, although antibiotic-resistant strains are emerging worldwide. This highlights the need for preventive strategies.

#### **Pneumococcal disease**

The pneumococcus is the cause of serious invasive diseases such as pneumonia, meningitis and bacteremia. Elderly and children less than two years old are especially vulnerable to infections. The vast majority of pneumococcal pneumonia deaths in children occur in low-income countries. Pneumococci are also a common cause of middle ear infections and more than 60% of children have had at least one episode of acute otitis media in their first year. Middle ear infections are a frequent cause of a visit to a general practitioner and the use of antibiotics. The pneumococcus is normally carried in the nose or upper throat (nasopharynx) and up to 90% of children carry the bacterium asymptotically. Carriers can transmit the bacterium and nasopharyngeal colonization precedes pneumococcal infections. Antibiotics such as penicillin are generally effective for treating pneumococcal infections, but growing resistance to conventional antibiotics underlines the urgent need for vaccines to be used to control pneumococcal disease.

#### **Pneumococcal vaccines**

All currently marketed pneumococcal vaccines are based on the capsular polysaccharide, either non-conjugated (23-valent) or conjugated (7,9,10&13-valent) to a carrier protein. The conjugated vaccines appear to be very efficacious against the homologous serotypes. However, more than 90 different serotypes have been identified so far and there is evidence that mass vaccination results in serotype replacement. More serotypes need to be included for broader protection, which, however, has numerous technical and financial limitations. Also, the level of protection against otitis media is limited. Currently the research on vaccines focuses on the development of a "common protein" vaccine that could provide broad

protection against all serotypes, which has also the potential to protect against otitis media. Protein antigens with protective potential are currently being studied as new vaccine components (Miyayi et al. Cell Mol Life Sci. 2013 Sep; 70(18):3303-26).

### **Mucosal vaccination**

By far the most vaccines that are currently on the market are needle-based, which complicates mass-vaccination programs and is not always leading to the most effective responses, especially in the case of mucosal (respiratory and gastrointestinal) infections. There is strong evidence that, in order to induce a protective immune response against respiratory infections, mucosal application of antigens is most optimal. No mucosal vaccine against *S. pneumoniae* has yet been developed. Natural colonization or carriage induces both mucosal and systemic humoral and cellular immune responses. Enhancing those responses by mucosal vaccination is an attractive immunization approach as it mimics the natural route of infection (Riese et al. Expert Opin Drug Deliv. 2014 Oct;11(10):1619-34).

### **Particulate-based vaccine formulations**

The immunogenicity of antigens is dependent on the formulation. Antigens delivered in particles are better recognized by the immune system and are generally more effective than soluble antigens at stimulating protective immunity. Particulate formulations have comparable dimensions to pathogens and facilitate antigen uptake by antigen presenting cells, inducing a more effective type of immune response that corresponds with the natural immune response elicited by the bacteria itself (Lycke, Nat Rev Immunol. 2012 Jul 25;12(8):592-605; Rosenthal et al. 2014 Aug;28:51-8). Examples of particulate delivery systems include outer membrane vesicles (OMV), polymersomes and [REDACTED]. The advantage of OMV particles originating from Gram-negative bacteria is that these vesicles have intrinsic adjuvant activity supplied by various molecules, as well as the possibility to engineer these particles with integrated antigens of interest. (Acevedo et al. Front Immunol. 2014 Mar 24;5:121). Polymersomes are FDA approved synthetic particles made for drug delivery. The composition, size, contents and cell-targeting properties of these particles can be engineered (Sharma et al. Biotechnol Adv. 2015; 33(1):64-79). Polymersomes allow the possible use of peptides derived from antigens, which are easier to produce than whole antigens, but are usually poorly immunogenic when administered in soluble form. [REDACTED] [REDACTED]). The optimal immune response induced by these particles can be addressed by varying particle characteristics and by the addition of immunomodulatory molecules with adjuvant properties that skew the immune response to elicit the proper anti-bacterial response (Sharma et al. Biotechnol Adv. 2015; 33(1):64-79).

### **3.2 Purpose**

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

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

**The main objective of our project is to develop mucosal vaccines to protect against *S. pneumoniae* infections using particulate delivery strategies.**

Research questions:

- Which antigens are needed to induce broad protection by intranasal vaccination to prevent infection with different *Streptococcus pneumoniae* strains?



- What is the optimal particle-based formulation in order to induce a strong protective immune response at the port of entry (i.e. intranasal cavity) for *S. pneumoniae*?
- What is the mechanism of protection induced by the particle-based formulations and can we enhance effective immune responses against pneumococcal protein antigens by intranasal vaccination?

#### Explanation of feasibility:

To accomplish this purpose, the experiments will be performed by experienced scientist and biotechnicians who have been involved for many years in research on infectious diseases and vaccine development. All necessary facilities are accessible. The mouse vaccination and colonization model has been established for years and has frequently be used. Expertise on vaccine design and production is available within [REDACTED] [REDACTED] The design of the research plan is clear and focused in order to make it feasible to achieve our main objective within the current project.

Salmonella outer membrane vesicles displaying high densities of pneumococcal antigen at the surface offer protection against colonization. Kuipers K, Daleke-Schermerhorn MH, Jong WS, ten Hagen-Jongman CM, van Opzeeland F, Simonetti E, Luirink J, de Jonge MI. Vaccine. 2015 Apr 21;33(17):2022-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.010.

The vaccine potential of Bordetella pertussis biofilm-derived membrane proteins. de Gouw D, Serra DO, de Jonge MI, Hermans PW, Wessels HJ, Zomer A, Yantorno OM, Diavatopoulos DA, Mooi FR. Emerg Microbes Infect. 2014 Aug;3(8):e58. doi: 10.1038/emi.2014.58.

Proteomics-identified Bvg-activated autotransporters protect against bordetella pertussis in a mouse model. de Gouw D, de Jonge MI, Hermans PW, Wessels HJ, Zomer A, Berends A, Pratt C, Berbers GA, Mooi FR, Diavatopoulos DA. PLoS One. 2014 Aug 18;9(8):e105011.

Two DHH subfamily 1 proteins contribute to pneumococcal virulence and confer protection against pneumococcal disease. Cron LE, Stol K, Burghout P, van Selm S, Simonetti ER, Bootsma HJ, Hermans PW. Infect Immun. 2011 Sep;79(9):3697-710. doi: 10.1128/IAI.01383-10.

Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines. Audouy SA, van Selm S, van Roosmalen ML, Post E, Kanninga R, Neef J, Estevão S, Nieuwenhuis EE, Adrian PV, Leenhouts K, Hermans PW. Vaccine. 2007 Mar 22;25(13):2497-506.

Lactococcus lactis GEM particles displaying pneumococcal antigens induce local and systemic immune responses following intranasal immunization. Audouy SA, van Roosmalen ML, Neef J, Kanninga R, Post E, van Deemter M, Metselaar H, van Selm S, Robillard GT, Leenhouts KJ, Hermans PW. Vaccine. 2006 Jun 29;24(26):5434-41.

### 3.3 Relevance

---

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

---

*Streptococcus pneumoniae* is an important cause of severe infections such pneumonia, meningitis, bacteremia and otitis media. People at risk of developing pneumococcal infections are young children, the elderly and immune-compromised persons. The pneumococcus is the leading cause of childhood pneumonia, the number one killer of children under five years in the developing world. The efficacy of the currently available vaccines are highly suboptimal as they do not protect against all serotypes, and the leads to resurgence of pathogenic serotypes causing diseases that are not covered by the current vaccines. The development of effective vaccines with broad protection will have major benefits in reducing morbidity, mortality and health care costs. Analysis of the effective induction of mucosal vaccine responses will contribute to the improvement of vaccination

strategies and in developing novel vaccine formulations resulting in optimal protection against important respiratory pathogens, such as *S. pneumoniae*.

### 3.4 Research Strategy

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

The project contains three parts, of which the first two parts will be launched simultaneously:

1. Identification of vaccine antigens for the induction of broad protection by intranasal vaccination.
2. Testing and optimization of particles-based formulations to further improve broad intranasally-induced protection.
3. Determine the optimal intranasal vaccine formulation for protection against pneumococcal colonization

##### Part 1

Different state-of-the-art antigen discovery technologies are currently developed to identify virulence-associated proteins, which are potential new vaccine antigens from *Streptococcus pneumoniae*. Transposon sequencing (Tn Seq) is a transposon-based technology. Transposons are mobile genetic elements that are capable of efficient genomic insertion. Insertion of a transposon leads to gene inactivation. By whole-genome transposon insertion mutagenesis, mutant libraries can be generated. These libraries allow for the selection of genes essential for infection, thus encoding potential vaccine antigens. Mimicking in vivo growth (MIVG) is an in vitro method to determine which proteins are expressed during infection by mimicking in vivo conditions. During infection (in vivo growth), bacterial pathogens express genes that are usually not expressed under laboratory conditions. From a pathogen's perspective, access to adequate nutrition is of fundamental importance for survival in the host. The ability to counter microbial survival by restricting essential nutrients is referred to as nutritional immunity. By depleting such essential elements, in vivo conditions can be mimicked in vitro. In vivo expression (IVE) analyses have been successfully used for different pathogenic bacteria to study gene expression during infection. Bacteria will be collected from samples taken during infection of animals (i.e. nasopharyngeal aspirate and lung lavages) to isolate bacterial mRNA which will be used for sequencing and subsequent analyses to determine which genes are expressed during infection, as the encoded proteins are potential interesting vaccine candidates.

With the unique combination of these tools, the most promising vaccine antigens will be selected. Antigens that have been selected as potential new vaccine antigens will be tested for their protective potential against colonization. These antigens will be immunized intranasally with a known mucosal adjuvant, such as Cholera Toxin subunit B. The protective potential will be evaluated for their ability to reduce the level and/or duration of colonization by pneumococci as well as detailed analysis of the antibody responses induced. Variable antigens that show sequence diversity among strains will be tested in challenge with heterologous pneumococcal strains as well in order to establish its efficacy against a broad spectrum of pneumococcal strains.

##### Part 2

For an efficient and lasting immune response to vaccination, antigens should be presented as particles such as Outer Membrane Vesicles (OMV), Polymersomes ((FDA approved synthetic particles originally made for drug delivery) [REDACTED] to take advantage of the multivalency effect. Particle-based vaccines, will be tested in vaccination experiments with model pneumococcal antigens that have already been shown to induce partial protection against colonization by pneumococci. The use of model antigens is chosen, to avoid the need for having to

test the novel antigens selected in part 1 in multiple particulate delivery systems, which would result in an increase in the total amount of animal experiments. Different variants of the particles will be tested for the induction of an optimal immune response against colonization. Variation in particle properties such as size, shape, immune-modulating and composition of the particles will be studied in immunization and pneumococcal colonization studies. For variation in composition OMV's of different bacterial backgrounds (of Gram-negative bacteria, since pneumococci are Gram-positive bacteria that do not produce membrane vesicles of its own) will be engineered with various traits. For polymersomes originated by the synthesis of different block polymers can be engineered for optimal immune induction. [REDACTED]

[REDACTED]. Efficacy against the various vaccines will be determined by their ability to reduce the level and/or duration of colonization by pneumococci. To understand the induction and kinetics of humoral and cellular immunity at the mucosal (intranasal) level induced by the different particle formulations and to identify the immune correlates of protection different immunological investigations will be conducted. IgA and IgG responses in the nasal cavity, and different cytokines and chemokines, which are in addition to antibodies important immune effectors, will be measured at different time points. In addition the influx of immune cells, such as APCs, in particular macrophages but also T- and B-cells will be determined using immunohistochemistry and flow cytometry. Understanding the induction of a protective immune responses at the intranasal level is crucial to develop novel vaccines.

### Part 3

The antigens with the best protective potential as evaluated in part 1, which resulted in reduction of colonization and with the ability to induce broad range protection against multiple serotypes, will be tested with the most promising particle strategy as evaluated in part 2. Antigens will be tested individually as well as in combinations in order to finally selected for a prototype vaccine formulation.

For surface exposure on particles, production of the whole protein is not always possible (like on outer membrane vesicles), and derived peptides are often easier to produce than full length proteins.

For all three parts, a colonization model will be used to determine the efficacy of the vaccines. After 3 immunizations, mice are intranasally colonized with pneumococci, and bacterial load and specific immune parameters can be analyzed.

---

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.

All relevant information for the studies involved is described in the research strategy.

---

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 purpose of these studies are focussed on inducing effective mucosal immune responses in mucosal vaccination with particulate formulations of antigens. The success of these formulations depend on the antigens used as well as on the particulate system chosen. Both the selection of antigens with protective potential and the ability to induce broad protection against multiple serotypes as the choice for a specific particulate vaccine delivery system with its respective characteristics for the induction of a proper immune response are of great importance. It provides the opportunity to find

the optimal induction of an effective immune response to protect against pneumococcal infections. This research will lead to the development of a pneumococcal, particle-based, mucosal vaccine prototype.

The milestones for this project for the coming 5 years are formulated as follows:

- Milestone 1: The most promising broadly protective antigens have been selected.
- Milestone 2: The different particles and variation in characteristics, such as optimal shape, size and modification of particles have been tested for induction of an optimal immune response against colonization.
- Milestone 3: Selection of a particle-based delivery system most optimal of inducing an protective immune responses as a for further vaccine studies.
- Milestone 4: Establishment of optimal composition of the in milestone 3 selected particle-based delivery system together with two or more proteins as selected in Milestone 2. Optimal induction of an immune response is established by:
  1. reduction in the level of colonization compared to negative control groups (indication of vaccine efficacy)
  2. antibody responses in serum and nose lavages (indication of immune responses)
  3. cellular immunity such as analysis of cytokines important for clearance of pneumococcal colonization, such as IL-17 and IFN-gamma (indication of type immune response).

The reduction in colonization is the most important parameter. Since serum and nose lavage is collected when the animals are sacrificed, antibody responses as well as cellular responses can be established in the same samples.

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             | Colonization model       |

## 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'.                                            | 10300                                      |                                                |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.                                                                                         | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |                                                |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br><i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number<br>1                         | Type of animal procedure<br>Colonization model |

## 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.

---

#### Colonization model

The protection elicited by mucosal pneumococcal vaccines will be determined in a colonization model, the mildest model available, since mice will not develop invasive disease. In this model vaccines will be administered intranasally under inhalation anesthesia. Colonization in the nose is induced three weeks after the last immunization to ensure proper immune induction has been elicited, and reduction in colonization together with immunological parameters is the read-out for vaccine efficacy.

The primary outcomes of the colonization model are:

- The level of colonization in the nasal cavity. A reduction in bacterial or a reduction in the duration of colonization is an important parameter to establish vaccine efficacy.
- Antibody responses in nose lavages, nasal tissue or blood. Antibody titers are important parameters after vaccination to determine immunogenicity of the vaccine components.
- Cellular immunity, such as cytokine analysis or studying specific immune cells can be performed in order to establish the specific characteristics of the immune response induced and their role in protection.

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

---

Mice will be immunized three times intranasally under inhalation anesthesia with a 10 µl volume. The animals will be immunized with 2-3 week intervals between immunizations, as done in our previous studies and based on optimal vaccination schedules as described for these type of vaccine studies. Vaccines will be composed of pneumococcal antigens administered with an mucosal adjuvant. In parts 2 and 3 of our research strategy, the antibodies will be administered as part of a particulate delivery systems with a mucosal adjuvant and additionally, immune modulating molecules can be administered for optimization of the required immune response. Blood is collected from the tail vein for preparation of serum before the first and 2 weeks after the final immunization samples in order to establish immunogenicity of the vaccines by determination of antibody titers. Mice will be infected intranasally under inhalation anesthesia with a 10 µl volume. Mice will be sacrificed 1-14 days post infection, depending on the read-out timepoint required for the individual experiment. A nose lavage will be performed to collect bacteria from the nose in order to be able to determine primary and secondary read-out parameters. Inhalation anesthesia is used for the intranasal administration of vaccines and infection dose in order to deliver this properly and reduce the spread to a minimum.

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

---

The number of animals needed per group are calculated with a power analysis according to the following formula:

$$N = 2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot s^2 / d^2$$

The desired power use will be 0,80 and alpha of 0,05. In case multiple comparisons are performed, the value of alpha will be corrected for the total number of comparisons and the  $Z_{\alpha/2}$  will be adjusted accordingly. The estimated standard difference will be based on previous experiments. If a single control group is used in comparisons with multiple experimental groups, we were advised by a statistician (G. Borm) to enlarge the size of this group.

## **B. The animals**

---

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

---

### Mouse species

The colonization model using both inbred and outbred mice is an established animal model in our laboratory. The inbred strains BALB/c and C57BL/6J are most commonly used in colonization models described in literature. In BALB/c mice the immune response is predominantly Th2-skewed, while in C57BL/6J mice the response is predominantly Th1-skewed. The use of the (CB6)F1 generation hybrid mice of a cross between BALB/c and C57BL/6J allows studies in a more intermediate Th1/Th2 background. We will be using one mouse species for the screening of the antigens and the particle-based vaccine delivery systems. As pneumococcal vaccines need to induce protection in a broad range of individuals it is important to allow the use of different mouse strains with a different Th1/Th2 skewing in the final experiments of the third part.

Sex-based differences in susceptibility to pneumococcal infections have been described in literature (Kadioglu et al, 2011), so using both sexes in experiments has to be avoided to reduce spread (and group size) to a minimum. We prefer to use female mice over male mice, since they are easier to maintain in groups as they are less aggressive.

### Estimated number of animals

Taken together, as outlined in the rest of the proposal, there are 3 experimental parts.

For the first part, identification of vaccine antigens, we need a maximum number of 480 mice. For performing experiments in which we will test 5 different protein antigens per experiment together with a negative control (adjuvant only) and a positive control with group sizes of around 10 mice (based on previous experiments) and control groups of 15 mice, this will be a number of 80 mice per experiment. We estimate to test a maximum number of 20 antigens and to test 10 of these antigens in heterologous challenge (with a different serotype), this will make a maximum total number of 480 mice for the first part of the research strategy.

For the second part, the particle-based vaccine delivery systems, we need a maximum number of 900 mice. In order to establish the optimal induction of an immune response three particle-based vaccine formulations will be studied for their antigen delivery capacity and immune induction capacity. To be able to vary the particles according to size, shape, composition, the addition of immune modulating molecules and display of the

antigens, 5 experiments will be estimated per particle studied, with 6 groups of around 10 mice per group. This will make a maximum amount of 300 mice per particle, and a maximum number of 900 mice for the second part of the research strategy.

For the third part, the most promising antigens with protective potential selected that will be formulated with the specific particulate delivery vehicle selected, we need a maximum number of 510 mice. To be able to conduct experiments for at least three variants of a selected protein (full length protein and derived peptides) for 4 proteins, with group sizes around 10 and including positive and negative controls, 180 mice will be needed. The most promising antigen candidates will be combined in single vaccine formulations and compared in efficacy to single antigen formulations. This will be done in Three different mouse strains, to be able to evaluate the protective potential in different Th1/Th2 skewed backgrounds. For this final part, per mouse strain, 110 mice will be needed 110 mice will be needed for 8 groups and a positive and negative control, so 330 mice will be needed. This will make a total number of 180+ 330 + 510 mice for the third part of the research strategy.

Hence, the maximum number of mice needed for this project is estimated to be  $480 + 900 + 510 = 1890$  mice.

| Species                      | Origin                                          | Maximum number of animals | Life stage           |
|------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|----------------------|
| Mouse:CB6F1, C57BL/6, BALB/c | Registered breeding facility/supplier within EU | 1890                      | 6-8 weeks at arrival |

### 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



Protective effects against colonization cannot be studied in vitro and requires animal models. The mouse colonization model is the most convenient small animal model that can be used to measure colonization and the lowest animal species sufficient to study this. Other colonization models are developed in rhesus macaques (Philipp et al., 2006) and ferrets (McCullers et al., 2010).

#### Reduction

We will not use more animals than the minimal amount that is needed to obtain statistically significant differences between the groups. Intranasal immunization and infection procedures are performed under inhalation anesthesia to reduce spread (and group size) to a minimum. Preselection of antigens will be done by different antigen discovery technologies that enable us to select antigens predicted to be able to have a role in protection based on criteria as presence on the bacterial surface, conservation and predicted MHC epitopes. The particulate antigen delivery systems will be evaluated for their immunogenicity and potential of inducing protection in studies using model pneumococcal antigens known to be involved in protection, so the selected antigens of part 1 do not have to be tested in all particulate system studied in part 2.

#### Refinement

Animals will be housed in small groups. The colonization model is the mildest infection model, since these animals will not develop disease. The highest discomfort in this model will be awakening from anesthesia used for intranasal immunization and intranasal infection. Since vaccination and infection experiments cannot be performed without these immunizations and administration of infection, the experiment cannot be performed with less discomfort for the animals. With the procedures discussed previously, we believe this is the best way to perform such an experiment with regard to optimal experimental outcome relevant for induction of protection and immune responses induced, with as little discomfort to the animals as possible.

---

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

---

The colonization model is the mildest infection model, since the mice will not develop invasive disease. The highest degree of discomfort will be the awakening from the anesthesia used for the intranasal administration of the immunizations and the infection which is minimized by using inhalation anesthesia. To minimize adverse effects after infection, we monitor the mice daily, and if necessary act according to humane endpoints.

## 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 of the Directive 2010/63/EU?

☒ No

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

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

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☒ No > Continue with question I.

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

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

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

---

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

---

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

---

The colonization model is a mild model, since mice will not develop invasive disease.

The mice will experience some discomfort caused by the use of anesthesia used for intranasal immunizations and infection.

If case serum or plasma is needed, mice will experience some discomfort of blood collection from the tail vein in order to obtain pre-immune and post immune sera in vaccination studies. Adverse effects on welfare caused by the use of vaccines are low, although some weight loss may occur post immunization, either because of the use of anesthesia or local immune reactions to the vaccine formulation used.

Explain why these effects may emerge.

---

The discomfort of the anesthesia is caused by waking up from anesthesia.

The discomfort of blood collection from the tail vein is caused by pre-heating and some restrained while being pricked with a needle.

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

---

Inhalation anesthesia is used, which allows rapid induction and recovery.

Blood collection from the tail vein and administration is performed by experienced researchers in order to reduce the discomfort to a minimum.

### **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.

---

- Loss of body weight of more than 15% in 1-2 days or more than 20% from the start of the experiment, according to the international guidelines of humane endpoint.

- On signs of invasive disease, such as abnormal behavior, reduced mobility, pre-moribund state and severe suffering.

All above described criteria could be manifested in case of complication of disease, i.e. sepsis or pneumonia, which is very unlikely in the described colonization model. If any of this states is determined, mice will be removed from the experiment.

Indicate the likely incidence.

---

The chance of reaching humane endpoints will be very low, since the model used is a colonization model and these mice will not develop invasive disease. So human endpoints can be reached because of causes not linked to experimental procedures or low infection related incidence of less than 1%.

#### **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 severity is mild for all mice, since mice will not develop disease.

## **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.

---

End of experiment. We need to assess bacterial recovery in the nasal tissue, for that we need to harvest nasal tissue by opening up the skull/nasal cavity.

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

---

## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0139
2. Titel van het project: Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën tegen pneumokokken infecties
4. Type aanvraag:
  - ☐ nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ☐ ontvangen door DEC: 22-12-2015
  - ☐ aanvraag compleet
  - ☐ in vergadering besproken: 05-01-2016
  - ☐ anderszins behandeld
  - ☐ termijnonderbreking(en) van 13-01-2016 tot 25-01-2016 en van 01-02-2016 tot 22-02-2016
  - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - ☐ aanpassing aanvraag: 25-01-2016 en 22-02-2016
  - ☐ advies aan CCD: 07-03-2016
7. Eventueel horen van aanvrager
  - 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: 13-01-2016
  - Strekking van de vragen:

### Project Proposal:

-3.2 Dit is doorlopend onderzoek, dat al een tijd bezig is en dat ook na de komende 5 jaar nog zal doorgaan. Dat heeft tot gevolg dat niet geheel duidelijk wordt wat de onderzoekers in de komende 5 jaar willen bereiken. Mag de commissie aannemen dat het realistisch is dat dit onderzoek binnen de komende 5 jaar zal leiden tot “the development of a pneumococcal, particle-based, mucosal vaccine prototype” dat eventueel klinisch kan worden getest? Het is

bij dit type doorlopend onderzoek wellicht goed om bij vraag 3.4.3 een aantal “milestones” op de weg naar dat doel voor de komende 5 jaar aan te geven (zie ook vraag 3.4.3).

-3.2 De onderzoekers worden verzocht de jarenlange betrokkenheid bij het onderzoek naar infectieziekten en vaccinontwikkeling te illustreren met enkele referenties naar eigen onderzoek waar deze betrokkenheid uit blijkt en waaruit blijkt dat het muis vaccinatie en kolonisatie model een geaccepteerd en gevalideerd model is.

-3.4.1 Onderdeel 1: Wat zijn de nieuwe ‘state of the art antigen discovery technologies’ waar de onderzoekers op duiden en aan welke virulentie-geassocieerde antigenen denken de onderzoekers? Hoe worden de meest veelbelovende antigenen geselecteerd?

-3.4.1 Onderdeel 3: Uit de beschrijving van de dierproeven in de bijlage blijkt dat zowel het volledige eiwit als peptides daarvan zullen worden getest. Deze beschrijving ontbreekt hier, evenals de uitleg waarom dit belangrijk is voor de ontwikkeling van een vaccin.

-3.4.3 Welke milestones verwachten de onderzoekers in hun onderzoek de komende 5 jaar te bereiken?

-3.4 Bij het opwekken van een immuunrespons zijn zeer veel factoren van belang. Wat zijn de belangrijkste factoren in dit veld, en van welke factoren verwachten de onderzoekers de meeste impact? De commissie zou graag een prioritering van de te onderzoeken factoren in de beschrijving van de strategie zien.

#### **Description of Animal Procedures:**

-B, De onderzoekers willen drie muizenstammen gebruiken, met elk een iets ander patroon in de immuunrespons. Het blijkt niet de bedoeling om alle experimenten in alle muizenstammen uit te voeren omdat het aantal benodigde muizen berekend wordt op basis van een eenmalige uitvoering van experimenten. Waar hangt de keuze voor de muizenstam van af? De onderzoekers worden verzocht dit duidelijker toe te lichten.

- Datum antwoord: 25-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

#### **Project Proposal:**

- 3.2 Mucosale vaccinatie tegen pneumokokken en andere respiratoire pathogenen is een speerpunt van het onderzoek op ons lab en dit zal in de toekomst ook een belangrijke focus van het onderzoek blijven. Het is niet ondenkbaar dat dit onderzoek over 5 jaar voor een van de “particle-based mucosal vaccine prototypes” voorgezet zal worden in een eerste klinische studie in mensen. Voor de komende 5 jaar is het doel om te komen tot het ontwerp van een particle-based mucosal vaccine prototype, dat in staat is tot het induceren van brede bescherming tegen meerdere serotypes. De inductie van een optimale immuunrespons voor deze bescherming zal bepaald worden door de selectie van de te gebruiken antigenen in combinatie met het te selecteren particle-based delivery systeem.

Het volgende is toegevoegd bij 3.4.3.: The milestones for this project for the coming 5 years are formulated as follows:

Milestone 1: The most promising broadly protective antigens have been selected.

Milestone 2: The different particles and variation in characteristics, such as optimal shape, size and modification of particles have been tested for induction of an optimal immune response against colonization.

Milestone 3: Selection of a particle-based delivery system most optimal of inducing an protective immune responses as a for further vaccine studies.

Milestone 4: Establishment of optimal composition of the in milestone 3 selected particle-based delivery system together with two or more proteins as selected in Milestone 2.

-3.2 De volgende referenties van ons eigen onderzoek met betrekking tot mucosale vaccinatie en het kolonisatie model zijn toegevoegd:

\*Salmonella outer membrane vesicles displaying high densities of pneumococcal antigen at the surface offer protection against colonization. Kuipers K, Daleke-Schermerhorn MH, Jong WS, ten Hagen-Jongman CM, van Opzeeland F, Simonetti E, Luirink J, de Jonge MI. Vaccine. 2015 Apr 21;33(17):2022-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.010.

\*The vaccine potential of Bordetella pertussis biofilm-derived membrane proteins. de Gouw D, Serra DO, de Jonge MI, Hermans PW, Wessels HJ, Zomer A, Yantorno OM, Diavatopoulos DA, Mooi FR. Emerg Microbes Infect. 2014 Aug;3(8):e58. doi: 10.1038/emi.2014.58.

\*Proteomics-identified Bvg-activated autotransporters protect against bordetella pertussis in a mouse model. de Gouw D, de Jonge MI, Hermans PW, Wessels HJ, Zomer A, Berends A, Pratt C, Berbers GA, Mooi FR, Diavatopoulos DA. PLoS One. 2014 Aug 18;9(8):e105011.

\*Two DHH subfamily 1 proteins contribute to pneumococcal virulence and confer protection against pneumococcal disease. Cron LE, Stol K, Burghout P, van Selm S, Simonetti ER, Bootsma HJ, Hermans PW. Infect Immun. 2011 Sep;79(9):3697-710. doi: 10.1128/IAI.01383-10.

\*Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines. Audouy SA, van Selm S, van Roosmalen ML, Post E, Kanninga R, Neef J, Estevão S, Nieuwenhuis EE, Adrian PV, Leenhouts K, Hermans PW. Vaccine. 2007 Mar 22;25(13):2497-506.

\*Lactococcus lactis GEM particles displaying pneumococcal antigens induce local and systemic immune responses following intranasal immunization. Audouy SA, van Roosmalen ML, Neef J, Kanninga R, Post E, van Deemter M, Metselaar H, van Selm S, Robillard GT, Leenhouts KJ, Hermans PW. Vaccine. 2006 Jun 29;24(26):5434-41.

-3.4.1 Onderdeel 1: De volgende state-of-the-art antigen discovery technologies zullen worden gebruikt (dit is tevens toegevoegd bij 3.4.1):

Transposon sequencing (Tn Seq) is a transposon-based technology. Transposons are mobile genetic elements that are capable of efficient genomic insertion. Insertion of a transposon leads to gene inactivation. By whole-genome transposon insertion mutagenesis, mutant libraries can be generated. These libraries allow for the selection of genes essential for infection, thus encoding potential vaccine antigens.

Mimicking in vivo growth (MIVG) is an in vitro method to determine which proteins are expressed during infection by mimicking in vivo conditions. During infection (in vivo growth), bacterial pathogens express genes that are usually not expressed under laboratory conditions. From a pathogen's perspective, access to adequate nutrition is of fundamental importance for survival in the host. The ability to counter microbial survival by restricting essential nutrients is referred to as nutritional immunity. By depleting such essential elements, in vivo conditions can be mimicked in vitro.

In vivo expression (IVE) analyses have been successfully used for different pathogenic bacteria to study gene expression during infection. Bacteria will be collected from samples taken during infection of animals (i.e. nasopharyngeal aspirate and lung lavages) to isolate bacterial mRNA which will be used for sequencing and subsequent analyses to determine which genes are expressed during infection, as the encoded proteins are potential interesting vaccine candidates.



-3.4.1 Onderdeel 3: Het volgende is toegevoegd bij 3.4.1:

For surface exposure on particles, production of the whole protein is not always possible (like on outer membrane vesicles), and derived peptides are often easier to produce than full length proteins.

-3.4.3 Zie antwoord 3.2

-3.4.3 Het volgende is toegevoegd aan 3.4.3:

Optimal induction of an immune response is established by:

1. reduction in the level of colonization compared to negative control groups (indication of vaccine efficacy)

2. antibody responses in serum and nose lavages (indication of immune responses)

3. cellular immunity such as analysis of cytokines important for clearance of pneumococcal colonization, such as IL-17 and IFN-gamma (indication of type immune response).

The reduction in colonization is the most important parameter. Since serum and nose lavage is collected when the animals are sacrificed, antibody responses as well as cellular responses can be established in the same samples.

#### **Description of Animal Procedures:**

-B, Het volgende is toegevoegd bij B:

We will be using one mouse species for the screening of the antigens and the particle-based vaccine delivery systems. As pneumococcal vaccines need to induce protection in a broad range of individuals it is important to allow the use of different mouse strains with a different Th1/Th2 skewing.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- Datum: 01-02-2016
- Strekking van de vragen:
  - Er blijft nog één onduidelijkheid over. Op de vraag waar de keuze voor de muizenstam van afhangt, antwoordt u: We will be using one mouse species for the screening of the antigens and the particle-based vaccine delivery systems. As pneumococcal vaccines need to induce protection in a broad range of individuals it is important to allow the use of different mouse strains with a different Th1/Th2 skewing. Het is nog steeds niet geheel duidelijk hoe de keuze voor een muizenstam wordt gemaakt. Het tweede deel van het antwoord suggereert (wederom) dat er in bepaalde delen van de studie getest zou kunnen worden op meerdere stammen om individuele verschillen na te bootsen. Uit de berekening lijkt echter te volgen dat u steeds op maar één muizenstam test. U gaat dus vermoedelijk toch een keuze maken. Het zou goed zijn als u vermeldt hoe u die keuze op een goede manier denkt te kunnen maken.
- Datum antwoord: 22-02-2016
- Strekking van de antwoorden:
  - Wij hebben ervoor gekozen om het laatste experiment van het derde gedeelte te testen in de 3 verschillende aangegeven stammen, om zo de vaccins te kunnen testen met verschillende Th1/Th2 skewing.

Het volgende hebben wij gewijzigd in de tekst bij choice animals: As pneumococcal vaccines need to induce protection in a broad range of individuals it is important to allow the use of different mouse strains with a different Th1/Th2 skewing in the final experiments of the third part.

En aan het eind van deze paragraaf: The most promising antigen candidates will be combined in single vaccine formulations and compared in efficacy to single antigen formulations. This will be done in three different mouse strains, to be able to evaluate the protective potential in different Th1/Th2 skewed backgrounds. For this final part, per mouse strain, 110 mice will be needed for 8 groups and a positive and negative control, so 330 mice will be needed. This will make a total number of  $180 + 330 = 510$  mice for the third part of the research strategy. Hence, the maximum number of mice needed for this project is estimated to be  $480 + 900 + 510 = 1890$  mice.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- 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.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

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

1. Het project is:
  - ☐ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to develop mucosal vaccines to protect against *S. pneumonia* infections using particulate delivery strategies.' Deze hoofddoelstelling is uitgewerkt in drie onderzoeksvragen betreffende de aard van de antigenen, de eigenschappen van de vaccin-deeltjes, en het mechanisme van de bescherming die ontstaat door vaccinatie. De uitkomsten van deze onderzoeksvragen zullen gecombineerd worden om een optimaal werkend intranasaal vaccin te ontwikkelen tegen *S. pneumoniae*. Tevens wordt duidelijk welke eigenschappen van antigenen en vaccin-deeltjes bijdragen aan een goede immuunrespons tegen *S. pneumoniae* en mogelijk andere bacteriën die luchtweginfecties veroorzaken. Het is aannemelijk dat dit niet alleen zal leiden tot nieuwe prototype vaccins, maar ook tot inzichten die voor de ontwikkeling van bescherming tegen andere infecties gebruikt zullen kunnen worden.

De commissie vindt het belangrijk dat onderzoekers de gelegenheid krijgen om dergelijk doorlopend onderzoek uit te voeren, in dit geval om (bestaande) vaccins te blijven verbeteren op basis van eerder behaalde resultaten en nieuwe inzichten in het onderzoeksveld.

*S. pneumoniae* veroorzaakt ernstige infecties zoals longontsteking, meningitis, bloedvergiftiging en middenoorontsteking. In ontwikkelingslanden is deze bacterie de hoofdveroorzaker van longontsteking bij jonge kinderen en de belangrijkste doodsoorzaak van kinderen onder de vijf jaar. De resultaten kunnen op termijn leiden tot de ontwikkeling van effectievere vaccins tegen *S. pneumoniae* en preventie van de infectieziekten die deze bacterie veroorzaakt. Vooral hele jonge kinderen en ouderen kunnen ernstige infecties ontwikkelen na blootstelling aan *S. pneumoniae*. Een ernstige infectie met *S. pneumoniae* wordt met antibiotica behandeld. Gezien de toenemende resistentie van bacteriën tegen antibiotica en de beperkte beschikbaarheid daarvan in ontwikkelingslanden, is het maatschappelijk van belang om effectieve vaccinatiestrategieën te ontwikkelen. De DEC acht meer inzicht in de factoren die bijdragen aan de effectiviteit van vaccinatie tegen luchtweginfecties en de ontwikkeling van effectieve vaccins tegen *S. Pneumoniae* van substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot de identificatie van antigenen die immuniteit tegen meerdere pneumokokken stammen opwekken, de bepaling van het effect van grootte, vorm en samenstelling van de vaccin-deeltjes op inductie van de humorale en de cellulaire immuunrespons, en de identificatie van een optimaal werkend intranasaal vaccin tegen *S. pneumoniae* bij muizen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de intranasale vaccinaties en de intranasale infectie en de gevolgen daarvan. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde bloedafnames uit de staartvene, de intranasale vaccinaties (3 maal) onder anesthesie, en de intranasale infectie onder anesthesie in als licht. De DEC is van mening dat de combinatie van deze factoren tot maximaal licht ongerief leidt. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als licht voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. De immuunrespons na vaccinatie is dermate complex dat zij niet goed bestudeerd kan worden zonder proefdiermodellen. Het immuunsysteem van de muis lijkt voldoende op dat van de mens, zodat dit onderzoek ook translationele waarde heeft.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. Om de

omstandigheden in de populatie voldoende na te bootsen worden de meestveelbelovende vaccins in drie muizenstammen uitgetest. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1890 muizen.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Het gekozen model veroorzaakt het minste ongerief voor de dieren, omdat zij voordat ze ziek worden al worden gedood. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.  
Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de aard van de antigenen die immuniteit tegen meerdere pneumokokken stammen opwekken en in het effect van grootte, vorm en samenstelling van de vaccin-deeltjes op inductie van de humorale en de cellulaire immuunrespons. Deze inzichten zullen leiden tot de identificatie van een optimaal werkend intranasaal vaccin tegen *S. pneumoniae* bij muizen. Het is aannemelijk dat deze resultaten op termijn zullen bijdragen aan de ontwikkeling van een effectief vaccin tegen *S. pneumoniae* voor humane toepassing. Het belang van meer inzicht in de factoren die de humorale en cellulaire immuunrespons vergroten en het beschikbaar komen van een effectief vaccin tegen *S. pneumoniae* acht de DEC substantieel, gezien de ernstige infecties die deze ziekteverwekker kan veroorzaken bij met name ouderen en jonge kinderen.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren licht ongerief zullen ondervinden als gevolg van de intranasale vaccinaties en infecties in combinatie met de benodigde handelingen. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

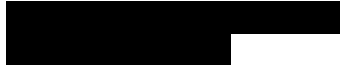
#### **E. Advies**

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

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen



Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**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  
AVD103002016454

**Bijlagen**

2

Datum 7 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002016454. 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: 10300  
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 41055629  
Straat en huisnummer: Geert Grooteplein 10  
Postbus: 9101, t.a.v. [REDACTED]  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
IBAN: NL90ABNA0231209983  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN (628)

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

- ☐ Een projectvergunning aanvragen
- ☐ Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- ☐ Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- ☐ Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- ☒ Alle bovenstaande opties

**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: 7 april 2016  
Geplande einddatum: 7 april 2021  
Titel project: Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën tegen pneumokokken infecties  
Naam DEC: RU DEC  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen  
E-mailadres DEC:

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen: ☒ Projectvoorstel  
☒ Beschrijving Dierproeven  
☒ Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen: ☒ Melding Machtiging  
☒ DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:  
Functie:  
Plaats: Nijmegen  
Datum: 7 maart 2016

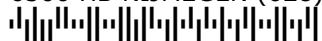


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**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  
AVD103002016454

**Bijlagen**

2

Datum 7 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 7 maart 2016

Vervaldatum: 6 april 2016

Factuurnummer: 16700454

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220:

projectnummer:2015-0139: Verantwoordelijk onderzoeker:



| Omschrijving                                                                     | Bedrag   |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD103002016454 | € 935,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

t.a.v. [redacted]

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



### 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

AVD103002016454

Bijlagen

1

**26 APR. 2016**

Datum

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 7 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections" met aanvraagnummer AVD103002016454. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### 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. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections" starten. De vergunning wordt afgegeven van 26 april 2016 tot en met 7 april 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 7 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD een algemene voorwaarde. De voorwaarde staat in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

#### **Bezwaar**

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

#### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



M. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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



## Centrale Commissie Dierproeven

### Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Adres: Postbus 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 26 april 2016 tot en met 7 april 2021, voor het project "Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections" met aanvraagnummer AVD103002016454, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 7 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 7 maart 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 7 maart 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 7 maart 2016, ontvangen op 7 maart 2016.

| Naam proef         | Diersoort/ Stam                                | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|--------------------|------------------------------------------------|---------------|-------|-------------|
| Colonization model | Muizen (Mus musculus) / CB6F1, C57BL/6, BALB/c | 1890          | Licht |             |

### 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 voorwaarde 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.

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 29 april 2016 12:42  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD103002016454

Geachte RU DEC,

Op 07-03-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Mucosal vaccination strategies against pneumococcal infections' met aanvraagnummer AVD103002016454.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

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 voorwaarde wijzigen of intrekken.

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

Met vriendelijke groet,

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

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

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)