

		Inventaris Wob-verzoek W17-09								
			wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.		document NTS 2017904	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Aanvraagformulier				x		x	x	
2		NTS initieel			x					
3		NTS definitief	x							
4		Projectvoorstel				x			x	
5		bijlage animal procedures				x			x	
6		Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7		Brief verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
8		Mail verzoek aanvulling nts				x		x	x	
9		Reactie aanvullende vragen				x		x	x	
10		DEC advies				x		x	x	
11		Advies CCD		x						x
12		Beschikking en vergunning				x		x	x	



16 MAART 2017

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 of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>Instantie voor dierenwelzijn</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	Instantie voor dierenwelzijn	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	Instantie voor dierenwelzijn																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Geert Grooteplein 10</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>9101</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 Grooteplein 10	Postbus	9101	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 10																
Postbus	9101																
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><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☐ Dhr. ☒ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☒ Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☐ Dhr. ☒ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☒ Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | ☐ Dhr. ☐ Mw. |
| Functie | Instantievoor Dierenwelzijn | |
| Afdeling | [Redacted] | |
| Telefoonnummer | [Redacted] | |
| E-mailadres | [Redacted] | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- ☐ Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- ☒ Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 1 2 _ 0 4 _ 2 0 1 7 |
| Einddatum | 1 2 _ 0 4 _ 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën voor preventie van pneumokokken infectie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | RU DEC 2016-0105 |
| Postadres | Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [Redacted] |
| E-mailadres | [Redacted] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287,00 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 en 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	[Redacted]
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	13 - 03 - 2017
Handtekening	[Redacted]

Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën voor preventie van pneumokokken infecties
1.2	Looptijd van het project	12-4-2017 - 12-4-2022
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Pneumokokken, vaccins, infecties, afweerrespons

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

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

3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	De pneumokok is een bacterie die ernstige infecties kan veroorzaken bij de mens. Deze bacterie is de belangrijkste oorzaak van longontsteking wereldwijd, maar kan daarnaast ook zorgen voor hersenvliesontsteking, bloedvergiftiging en oorontsteking. Jaarlijks sterven meer dan 1 miljoen kinderen over de hele wereld aan een door pneumokokken veroorzaakte infectie en daarmee is het de belangrijkste doodsoorzaak voor kinderen onder de 5 jaar. Vaccineren is de meest effectieve manier om infecties te voorkomen. Er zijn vaccins beschikbaar die, in de landen waar ze gebruikt worden, het aantal en de ernst van pneumokokken infecties sterk verminderd hebben. Deze vaccins beschermen echter alleen tegen de meest voorkomende varianten van deze bacterie (maximaal 13 van de meer dan 90). De vaccins helpen nauwelijks tegen oorontsteking, doordat de meeste oorontstekingen worden veroorzaakt door varianten waar de huidige vaccins niet tegen beschermen. Ons onderzoek richt zich op het ontwikkelen van nieuwe vaccinatiestrategieën om bescherming op te wekken tegen alle varianten van de pneumokok. Om dit te bereiken zullen nieuwe componenten, formuleringen en vaccinatieroutes getest en vergeleken worden. Bijvoorbeeld het vergelijken en combineren van de toediening van vaccins via naalden of de neus. Hiermee kunnen we onderzoeken hoe een specifieke en effectieve afweerrespons opgewekt kan worden die leidt tot volledige bescherming tegen de pneumokok. Daarnaast kan de verkregen kennis over vaccinatiestrategieën tegen de pneumokok ook bijdragen aan de ontwikkeling van vaccins tegen andere ziekteverwekkers.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Met behulp van dit onderzoek verkrijgen we meer inzicht in de optimale bescherming tegen infecties veroorzaakt door de pneumokok. Dit zal bijdragen aan meer inzicht in de mogelijkheden om infecties door deze bacterie te voorkomen en zal leiden tot de ontwikkeling van nieuwe prototype vaccins. Deze informatie kan daarnaast een belangrijke bijdrage leveren aan de vaccinontwikkeling tegen andere ziekteverwekkers.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Maximaal 2560 muizen.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De dieren zullen tijdelijk stress ondervinden door injecties in hun spieren of huid, de afname van bloedmonsters, het bijkomen uit een verdoving. Sommige dieren krijgen een longontsteking en zullen hierdoor ziek zijn.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Voor de meeste muizen (84%) wordt licht ongerief verwacht, aangezien de muizen niet ziek zullen worden. Voor een beperkt deel van deze studie, maximaal 16%, wordt matig ongerief ingeschat, omdat deze dieren een luchtweginfectie krijgen die zich kan ontwikkelen tot een longontsteking.

3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren zullen worden gedood, waarna verschillende monsters afgenomen zullen worden voor verder onderzoek.
-----	---	--

4 Drie V's

4.1	Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdierlijke alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	De afweerrespons opgewekt tegen vaccins en het effect van infectie met pneumokokken kan niet bestudeerd worden met proefdierlijke alternatieven. Een afweerrespons na vaccinatie leidt namelijk tot complexe interacties tussen de cellen van het immuunsysteem en andere weefsels die niet zonder proefdieren onderzocht kunnen worden.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	We gebruiken niet meer dan het minimum aantal dieren dat nodig is, om tot betrouwbare resultaten te komen die niet aan het toeval zijn toe te schrijven. Variatie in de resultaten wordt zo veel mogelijk voorkomen, zodat er minder dieren nodig zijn.
4.3	Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersoort(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	Muizen hebben een vergelijkbaar afweersysteem als de mens en behoren tot de minder complexe diersoorten binnen de proefdiersoorten. Wij voeren ons onderzoek zoveel mogelijk uit in studies waarbij de muizen niet ziek worden, om zo het ongerief voor de muizen zo laag mogelijk te houden.
4.4	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Binnen dit project maken we met name gebruik van milde experimenten waarbij muizen niet ziek worden. Dieren die een luchtweginfectie krijgen zullen drie keer per dag gecontroleerd worden. Wanneer de dieren meer ongerief hebben dan toegestaan voor dit experiment dan zullen ze uit de proef gehaald worden om onnodig lijden te voorkomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	

Form Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infections

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	☒ Basic Research ☒ Translational or applied research ☐ Regulatory use of routine production ☐ Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier ☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures
-----	---	--

☐ Higher education or training
☐ Forensic enquiries
☐ Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The burden of respiratory infections by *Streptococcus pneumoniae*

World-wide, the burden of respiratory infections caused by the bacterium *Streptococcus pneumoniae* (the pneumococcus) is high, despite the availability of antimicrobial agents and childhood vaccines. The pneumococcus kills approximately 500,000 children of less than five years of age, each year, mainly in the developing countries (Source: World Health Organization). Therefore, it is the leading cause of childhood pneumonia and consequently 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 globally. Strategies that prevent the manifestation of pneumococcal disease are therefore of high importance.

Pneumococcal disease

The pneumococcus is normally carried in the nose or upper throat (nasopharynx) and up to 90% of children carry the bacterium asymptomatically. Carriers can transmit the bacterium and nasopharyngeal colonization precedes pneumococcal infections. Especially elderly and children less than two years old are vulnerable to infections. The pneumococcus is the cause of serious invasive diseases such as pneumonia, meningitis and bacteremia. 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. 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 available pneumococcal vaccines are based on the capsular polysaccharide, either non-conjugated (23-valent) or conjugated (7,9,10&13-valent) to a carrier protein. Conjugate vaccines are 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. Therefore, more serotypes need to be included for broader protection, which, however, has numerous technical and financial limitations. Also, current vaccines show limited protection

against otitis media. To enable broad protection against all serotypes, research on vaccines focuses on the development of a "common protein" vaccine, 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).

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). Outer membrane vesicles can display a wide variety of antigens, thereby inducing an effective immune response. 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. On top of that, polymersomes can present antigens on their outside as well as release antigens from their internal side. [REDACTED] (Rivera and Espino, Exp Parasitol 2015). 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).

Parenteral and mucosal vaccination routes

By far, most vaccines that are currently on the market are parenterally administered. Although this results in a systemic activation of the immune system, it complicates mass-vaccination programs and is not always leading to the most effective responses, especially in the case of mucosal (respiratory and gastrointestinal) infections. Evidence about the induction of a protective immune response against respiratory infections, via mucosal application of antigens is accumulating. Nevertheless, knowledge about the communication between the mucosal and systemic immune system is largely lacking, which is essential to enable vaccine implementation. Currently, no mucosal vaccine against *S. pneumoniae* has 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). However, comparative studies are needed the effectiveness.

Prime-boost strategies To induce an effective long-lasting immune response multiple immunizations are often needed, referred to as prime-boost vaccination. Traditionally, priming and boosting is performed with the same vaccine and administered via the same route, resulting in a homologous immunization. However, combinations of different delivery platforms for priming and boosting can modulate the magnitude, quality and localization of the immune response. Data suggests that the combination of different vaccine delivery platforms using the same antigens, so called heterologous prime-boosting, may result in improved protection. Combinations of different particulate-based vaccine formulations are therefore of interest (Lu. Curr Opin Immunol. 2013 Aug; 21(3): 346-351). Similarly, the heterologous prime-boost approach can also be achieved by combining different routes of immunization. A combination of parenteral and mucosal vaccination, has the advantage of inducing immune responses in both the local and systemic compartments that are as strong or stronger than those resulting from homologous mucosal or parenteral vaccination alone (Fiorino et al. Front Immunol. 2013 Apr; 4(128)).

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 vaccination strategies that result in optimal protection against *S. pneumoniae*.

Research questions:

- Which particulate-based vaccine formulations (containing model antigens) results in the highest level of protection after parenteral vaccination?
- What is the mechanism underlying the communication between the mucosal and systemic immune system?
- Which prime-boost approach (particulate-based formulation + vaccination route) results in the highest level of protection?

Explanation of feasibility:

To accomplish the purpose of this study, the experiments will be performed by experienced scientists 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 been used. Expertise on vaccine design and production is available within the Laboratory of Pediatric Infectious Diseases and the Radboud University. The design of the research plan is clear and focussed 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 as 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 is suboptimal as they do not protect against all serotypes, which leads to resurgence of pathogenic serotypes that are not covered by licensed vaccines. The development of efficacious vaccines with broad protection will have major benefits on reducing morbidity, mortality and health care costs. Exciting recent advances in immunology and biotechnology led to a shift from empirical vaccine testing to rational vaccine design, opening opportunities for a systematic approach to improve vaccines. Apart from the selection of new antigens to protect against the majority of circulating pneumococcal strains, also antigen formulation and delivery will determine the success of vaccination. As particles are generally better recognized by the immune system than single purified components (such as protein antigen). This leads to a better antigen uptake and processing leading to a more efficient and robust immune response. In this study we would like to explore the mechanisms of induction and persistence of the immune responses upon vaccination with particle-based vaccines. In addition we would like to study the influence of the delivery route (systemic and mucosal) on vaccine efficacy. This will lead to fundamental scientific knowledge that can be generally applied in the vaccine field.

3.4 Research Strategy

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

Project is composed of three parts:

1. Testing antigen delivery systems for induction of broad protection via parenteral vaccination route
2. Comparing local and systemic immune responses via parenteral and mucosal vaccination routes.
3. Optimization of prime-boost strategies including various antigen delivery systems and vaccination routes.

Part 1.

Multiple particulate-based vaccines containing model antigens of *S. pneumoniae* are currently made which can be used in this study. This includes outer membrane vesicles, derived from different Gram-negative bacteria. Furthermore, polymersomes will be tested with different features including shape, size, antigen density and capsule thickness, all potentially contributing to vaccine efficacy. The potential of [REDACTED] as vaccine formulation will also be examined. All particulate-based vaccines will be tested in parenteral vaccination experiments with model Pneumococcal antigens that have already been shown to induce partial protection against colonization by pneumococci. We have chosen to select two model antigens, to avoid the need for having to test novel antigens in an early stage of the project, which would result in an increase in the total number of animal experiments. Based on our own experience and the available literature (K. Kuipers et al, Vaccine, 2015; 33(17), 2202-2209 & D.E. Briles et al, Vaccine, 1996; 14, 858-867), we know that this model antigens are (partially) protective against pneumococcal infections. These model antigens will be used as a control during the entire project. Approval for performing mucosal vaccination experiments with particle-based formulations using a colonization model has already been obtained.

Part 2.

Effective protection against *S. pneumoniae* should be mediated by both a potent systemic response and local immune response in the nasopharynx. To determine the optimal vaccination route, it is important to understand how the systemic and local immune response interact. We will compare the antigen localization after mucosal and parenteral vaccination route or a combination of both. This will include the localization of antigens and the immune response in different organs using in vivo imaging with labelled vaccine formulations. As immunological read-out the levels of humoral and cellular immunity will be measured.

Part 3. In order to induce a long-lasting, high quality immune response at the right location by vaccination, the route of administration and the vaccine formulation might be of importance. In part 3 we will test the potency of heterologous prime-boost strategies, meaning that we combine multiple vaccination routes or vaccine formulations in one vaccination scheme. This will involve a combination of parenteral and intranasal vaccination, or a combination of outer membrane vesicles, polymersomes and [REDACTED]. The results of part 1 and 2 will function as important input for this part of the study. The most promising particle-based strategy(ies) will be selected (part 1) and knowledge about the interaction between local and systemic immune system (part 2) will support the choice of the immunization strategy, this will therefore reduce the number of animals needed.

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

To study the efficacy of the new vaccination strategies described above, we mainly focus on the vaccination-colonization model as shown in the flow chart. In the first phase of the project we will test the efficacy of different antigen delivery systems and study the effect of using different vaccination routes. To do this, we will examine the efficacy in colonization experiments and by imaging antigen and immune response localization. Both colonization and imaging are preceded by the same vaccination schedule.

Based on the experimental data obtained in the first phase, we will select several potent delivery systems and vaccination routes (phase 2). Combinations of these conditions will be tested in phase 3, which will provide us valuable information about the chosen prime-boost strategies. This data enables us to select a strategy that induces the highest level of protection against colonization (phase 4). Solely this vaccination strategy will be examined in the vaccination-pneumonia model (phase 5). This is because, next to colonization, an effective vaccine should be able to prevent against disease.

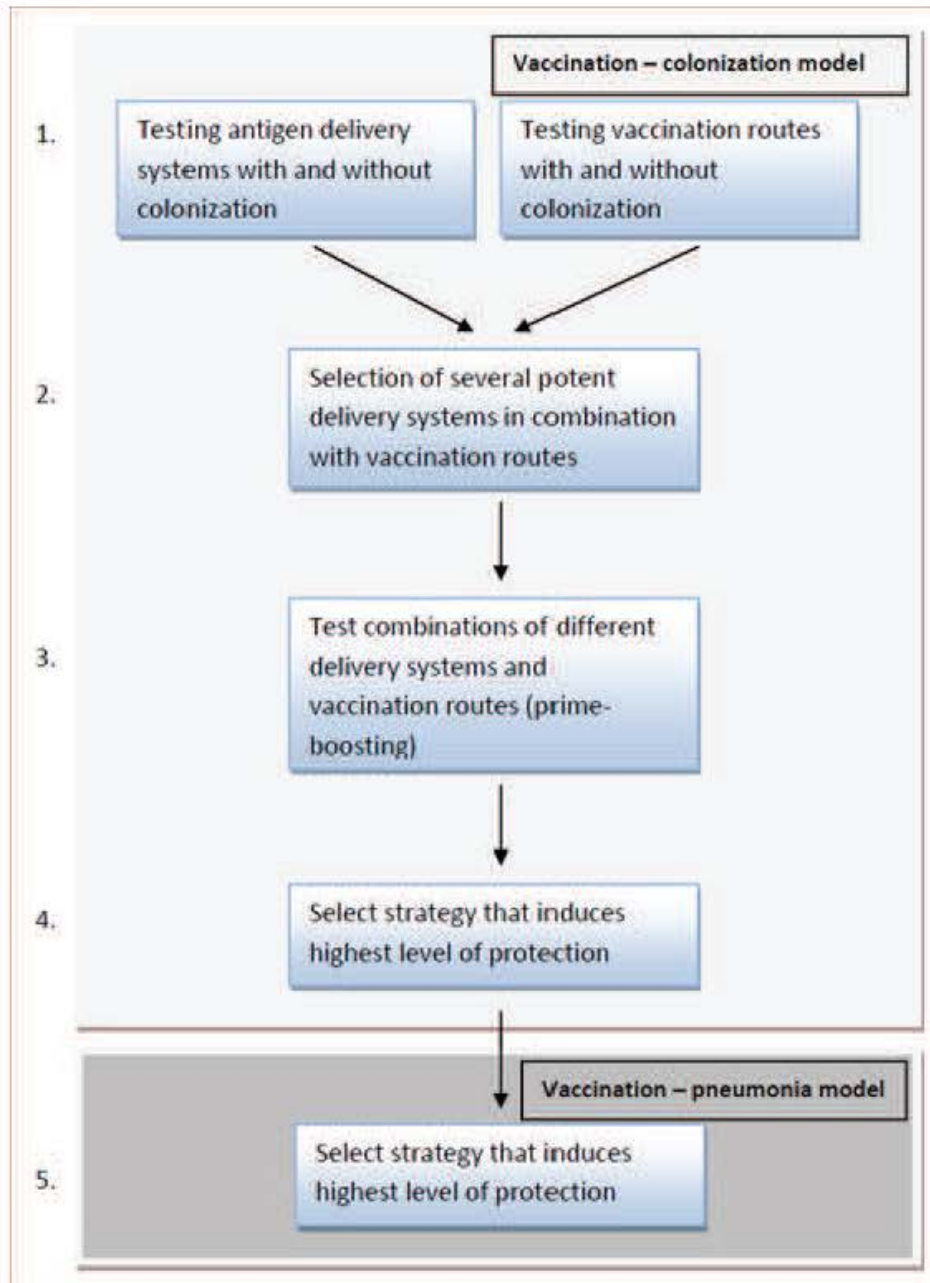
Using this step-by-step approach we will be able to identify new effective vaccination strategies that prevent both asymptomatic colonization and disease caused by *Streptococcus pneumoniae*.

The project will be started with multiple antigen delivery systems and vaccination routes that will be tested as described in the flow chart. However, delivery systems/vaccination routes will only be used in phase 2 if they result in (partial) protection against colonization by *S. pneumoniae* (phase 1). Thus we use the following criterion:

Go: at least partial protection against streptococcus pneumoniae

No go: no protection against streptococcus pneumoniae

Thereby we select the most potent strategies, which will be examined in the follow-up phases on the project. After each phase we will evaluate the potential of the strategy used based on the level of protection obtained. All the phases of the project will be performed using a limited number of promising antigen delivery systems/vaccination routes.



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 designing a vaccination strategy that results in protection against *S. pneumoniae*. Important features contributing to vaccine efficacy are the vaccine delivery system and the route of administration. Taken all three part of the project together, this provides the opportunity to find optimal induction of an effective immune response to protect against *S. pneumoniae* infections. Within this project a novel prime-boost strategy will be developed using particle-based vaccines. On top of that, fundamental knowledge about the interaction between mucosal and systemic immune system will be gained, which is essential to be able to produce effective vaccines.

The milestones covered by this 5-year project are:

- 1) Selection of particle-based vaccine(s) administered via parenteral vaccination that induce the highest level of protection against *S. pneumoniae*.
- 2) Selection of an strategy that combines mucosal and parenteral vaccination that results in an optimal immune response correlating with protection against *S. pneumoniae* has been found.
- 3) An optimized particle-based vaccine formulation containing model antigens administered via the optimal vaccination route has been found.

Optimal induction of an immune response is established by:

1. Strong reduction in the level of pneumococcal colonization in the upper respiratory tract and protection against pneumonia, as compared to negative control groups (indication of vaccine efficacy)
2. Antibodies in serum and nose lavages (indication of induction of immune responses)
3. Specific cellular immunity measured by specific T- and B-cell responses and production of cytokines important for clearance of pneumococcal colonization, such as IL-17 and IFN-gamma (indication of specific type of immune response).

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Vaccination-colonization model
2	Vaccination-pneumonia 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.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Vaccination-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.

Vaccination-colonization model

The effectivity elicited by mucosal and parenteral administered pneumococcal vaccines will be determined in a vaccination-colonization model. This is a one of the mildest models available, since mice will not develop disease. In this model, vaccines will be administered intranasally under inhalation anaesthesia or parenterally without anaesthesia.

Subsequently, colonization in the nose is induced three weeks after the last immunization to ensure that 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 experiments are:

- The level of colonization in the nasal cavity. A reduction in bacterial load 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.

Alternatively, instead of inducing colonization, we will evaluate the vaccine and immune response localization over the course of two weeks after the last immunization.

The primary outcomes of the localization experiments are:

- Localization of 111-Indium labelled vaccine antigens. The ability of a vaccine to reach target organs and tissues is a measure for vaccine efficacy.
- Localization of the immune responses induced by the vaccine. By studying the immune responses at sites reached by the vaccine antigens, we gain insight into the specific characteristics of the immune response induced by the vaccine.

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 or parenterally without anesthesia. Parenteral vaccination may include intramuscular, subcutaneous and intracutaneous administration. Multiple routes will be evaluated because the used administration route may influence the protective effect of the vaccine, due to differences in the immune reaction. The volumes used are according to the Code of practice: Immunization. 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 adjuvant. The antigens used, will be administered as part of a particulate delivery system. Additionally, adjuvants can be administered for

optimization of the required immune response. Blood can be 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. During colonization experiments, 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 administration of intranasal vaccines and the infection dose in order to deliver this properly and reduce the spread to a minimum. During vaccine and immune response localization experiments, mice will be anesthetized by inhalation anesthesia maximally 3 times within two weeks after the third immunization. Furthermore, organs will be collected post mortem for further analysis.

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 is 0,80 with an alpha value of 0,05. In case multiple comparisons are performed, the alpha value will be corrected for the total number of comparisons and the $Z \alpha/2$ will be adjusted accordingly. The minimum expected difference (d) will be set at 1 log on CFU counts and 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 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 vaccination experiments, using both inbred and outbred mice, are well established in our laboratory. The inbred strains BALB/c and C57BL/6J are most commonly used in vaccination 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 evaluating the potency of different particle based vaccine delivery systems and vaccination routes. However, 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 end when a selection of particles is made. As sex-based differences in susceptibility to pneumococcal infections have been described in literature (Kadioglu et al, 2011), the use of both sexes in this type of experiments has to be avoided to reduce spread (and group size) to a minimum and thereby lower the number of mice needed. For this reason publications about vaccine studies describe the use of either male or female mice, of which the majority uses females. Using both genders will inevitably lead to an increase in variation. This is explained by the following calculation: we expect (assumption) an increase of the standard deviation within a group when both sexes are used (e.g. σ increases from 1.2 to 1.5). To calculate the effect on the group size we use the formula: $N = 2 (Z \alpha/2 + Z\beta)^2 \cdot \sigma^2 / d^2$. Alpha, power and the expected difference stay the same when using female mice or both sexes. The difference in number of animals needed when using only female mice or both sexes is therefore solely determined by

the standard deviation. The fold increase of the group size when using both sexes is determined as follows: $\sigma_{\text{female+male}}^2 / \sigma_{\text{female}}^2 = 1.5^2 / 1.2^2 = 1.6$

When using both sexes throughout the project, the number of mice needed will increase based on the expected increase of the standard deviation to: $2560 * 1.6 = 4000$ mice. Therefore, to reduce the total number of mice, we will use solely female mice.

On top of that, we prefer to use female mice over male mice, since they are easier to maintain in groups as they are less aggressive. When using males, this increases the likelihood of the need for individual housing of the animals for several weeks, which increases the discomfort.

Estimated number of animals

Taken together, as described in the proposal, there are 3 experimental parts that involve the vaccination model.

For the first part, the protection against *Streptococcus pneumoniae* by parenteral vaccination using particle-based vaccine delivery systems, we need a maximum number of 990 mice. First of all, we will perform a pilot experiment to compare different parenteral vaccination routes, including intramuscular, subcutaneous and intracutaneous, to establish the most optimal vaccination route. As we aim to do this with a model particle for all three particle based vaccine formulations (outer membrane vesicles, [REDACTED] and polymersomes) described in this study, we will use 90 mice divided over 9 groups of 10 mice. Based on this pilot we will select the most optimal parenteral vaccination route for each particle, which we will use during follow up experiments.

In order to establish the optimal induction of an immune response, three particle-based vaccine formulations will be studied for their capacity to protect against colonization by *Streptococcus pneumoniae* and their immune induction capacity. To be able to vary the particles according to size, shape, composition, the addition of adjuvants and display of the antigens, 5 experiments were estimated per particle studied, with 6 groups of around 10 mice per group.

Table 1 describes the groups for the experiment studying the effect of shape of one formulation.

Similar groups will be made when studying the effect of size, composition, antigen and adjuvants. This will make a maximum amount of 300 mice per particle, and a maximum number of 990 mice (including 90 animals for the pilot experiment).

Furthermore, the differences in localization of antigens and immunological responses by different vaccination routes and particles will be examined as measure of vaccine efficacy. For each particulate based formulation three particles with different features according to shape, size and display of antigen will be tested. This will result in 9 experiments (3 different particles X 3 different variables), with 6 groups of around 10 mice per group. This will result in an experimental setup described in table 2, which is the same as shown in table 1 as at this time only a different read-out will be performed.

Performing this experiment 9 times, results in a maximum of around 540 mice in total.

For the third part, to study the potential of heterologous prime-boost strategies in inducing good protection against *S. pneumoniae*. Again for each particulate based formulation one particle type will be chosen and tested in a combination of parenteral and intranasal immunization in one vaccination scheme, followed by the colonization procedure. On top of that different particles can be combined in one vaccination schedule. This will result in a total of 9 experiments, with 6 groups of around 10 mice.

Table 3 describes the experimental groups for a heterologous prime-boost experiment including intranasal (I) and parenteral (P) vaccination using particle X.

When performing combining different particles instead of different vaccination routes, this will result in a similar experimental setup. Based on the experimental setup, for 9 experiments we will need a maximum of 540 mice for this part of the project.

Finally, particles or vaccination schedules that showed to be promising, will be evaluated in different mouse strains. This will include a maximum of 3 experiments using 10 mice of each strain with three strains.

So, all three some strains will be vaccinated with, for example, particle X. This is shown in table 4.

When performing this type of experiment three times, this results in a total of 90 mice.

Combining all mice experiments, the total of number mice needed for this project is estimated to be $990 + 540 + 540 + 90 = 2160$

Table 1

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	Neg. control: solvent only	N=10
2	Neg. control: adjuvant only	N=10
3	Shape A +adjuvant	N=10
4	Shape B +adjuvant	N=10
5	Shape C +adjuvant	N=10
6	Shape D +adjuvant	N=10
		Total = 60 mice per experiment

Table 2

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	Neg. control: solvent only	N=10
2	Neg. control: adjuvant only	N=10
3	Shape A +adjuvant	N=10
4	Shape B +adjuvant	N=10
5	Shape C +adjuvant	N=10
6	Shape D +adjuvant	N=10
		Total = 60 mice per experiment

Table 3

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	Neg. control: P+P+P solvent	N=10
2	Neg. control: I+I+I solvent	N=10
3	P+P+P particle X	N=10
4	I+I+I particle X	N=10
5	P+I+I particle X	N=10
6	I+P+P particle X	N=10
		Total = 60 mice per experiment

Table 4

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	CB6F1, particle X	N=10
2	C57BL/6, particle X	N=10
3	BALB/c, particle X	N=10
		Total = 30 mice per experiment

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse: CB6F1, C57BL/9, BALB/c	Registered breeding facility /supplier within EU	2160	6-8 weeks

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 of vaccination cannot be studied in vitro and requires animal models. The mouse colonization experiments are the most convenient small animal experiments 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). Similar to colonization, the lowest animal species are sufficient to image antigen and immune response localization over time, but cannot be performed without animals.

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 all infection procedures are performed under inhalation anesthesia to reduce spread (and group size) to a minimum.

Refinement

The vaccination-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 or imaging (depending on the read-out). Since studying vaccine efficacy cannot be performed without these immunizations and inducing infection/performing imaging, the experiment cannot be performed with less discomfort for the animals. 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 vaccination-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/imaging which is minimized by using inhalation anesthesia. To minimize adverse effects, we monitor the mice daily, and if necessary act according 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

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 vaccination-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 immunizations. However, for parenteral vaccination no anesthesia is needed, as discomfort due to anesthesia is higher compared to the vaccination procedure. In addition some discomfort will be caused by the use of anesthesia for induction of infection or the in vivo imaging.

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.

Explain why these effects may emerge.

The discomfort of the anesthesia is caused by waking up from anesthesia after intranasal vaccination, inducing colonization or imaging. 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. The number of times anesthesia is needed will be minimized. 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.

The chance of manifestation of disease, i.e. sepsis or pneumonia, and reaching the humane endpoints is very unlikely in the described vaccination-colonization model. Therefore we focus on the general humane endpoints.

General Humane Endpoints

If there is more or unexpected discomfort during an animal experiment, related or not related to the experiment , one should evaluate if a humane endpoint should be applied.

Criteria for application of a humane endpoint are:

- 1) The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment
- 2) The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the DEC
- 3) (reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment
- 4) The objective of the experiment has been reached

If any of these 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 using this model 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 > Continue with Section 3: 'Signatures'.

☒ 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. Furthermore we will collect organs for evaluating the localization of the immune response.

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

Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website www.zbo-ccd.nl.
- 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. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Vaccination-pneumonia 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.

Pneumonia model

The protection elicited by vaccines against pneumonia will be determined in a vaccination-pneumonia model. Pneumonia will be induced by the pathogen solely, or in co-infection with influenza virus for strains that are not capable to induce pneumonia alone. This model will be used to establish the efficacy of particulate-based vaccine formulations, that have shown to be protective against colonization shown in the vaccination-colonization model. In these studies mice will be immunized 3 times intranasally or parenterally with the chosen vaccine formulations. In addition, the efficacy of prime-boost strategies shown to be effective in the vaccination-colonization model, will be tested in this vaccination-pneumonia model. In both cases, the protection induced against the development of pneumonia will be analyzed.

The primary outcomes of the pneumonia model are:

- Pneumococcal recovery from the nose and lungs as a reduction in pneumococci reflects the relevance of the specific responses studied and an important parameter to determine vaccine efficacy.
- Humoral immunity, such as antibodies or complement proteins in nose lavages, bronchoalveolar lavages and blood. The humoral immune response will be studied by analysis of different components among which the antibody responses are the most important to correlate with protection.
- Cellular immunity, such as cytokine analysis or studying specific immune cells will be performed in order to determine the type of immune induction and activation, correlating with protection, that is induced.
- Disease scores and weight of mice, which reflect the effect on the health status of the mice.
- Histology on lung samples.

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

The particle based vaccine formulations will be administered three times with a 2-3 weeks interval via intranasal or parenteral route with volume volumes according to the Code of practice: immunization. Intranasal, but not parenteral, vaccination will take place under anesthesia. Parenteral vaccination strategies will include e.g. subcutaneous, intramuscular or intracutaneous administration as determined in the vaccination-colonization model.

A mild infection with influenza A virus will be induced intranasally, which is essential for the induction of pneumonia in this model (depending on the bacterial strain used), applied in a 10 µl volume without anesthesia. Five days after virus administration, the mice will be infected intranasally with pneumococci in a maximum volume of 40 µl, under inhalation anesthesia. The read-out will be the amount of bacteria present in the nose after infection, as well as immunological parameters in blood and lung homogenates at maximally 72 hours after infection. The animals will be euthanized by terminal bleeding under inhalation anesthesia followed by cervical dislocation.

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 is 0,80 with an alpha value of 0,05. In case multiple comparisons are performed, the alpha value will be corrected for the total number of comparisons and the $Z_{\alpha/2}$ will be adjusted accordingly. The minimum expected difference (d) will be set at 1 log on CFU counts and 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 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

In the vaccination-pneumonia model, we will use solely one mouse strain. This will be one of two following inbred strains: C57BL/6J or BALB/c mice. In BALB/c mice the immune response is predominantly Th2-skewed, while in C57BL/6J mice the response is predominantly Th1-skewed. However, to identify the ideal mouse strain for the vaccination-pneumonia model described here, we will perform a pilot experiment to compare the different mouse strains.

As sex-based differences in susceptibility to pneumococcal infections have been described in literature (Kadioglu et al, 2011), the use of both sexes in this type of experiments has to be avoided to reduce spread (and group size) to a minimum and thereby lower the number of mice needed. For this reason publications about vaccine studies describe the use of either male or female mice, of which the majority uses females. Using both genders will inevitably lead to an increase in variation. This is explained by the following calculation: we expect (assumption) an increase of the standard deviation within a group when both sexes are used (e.g. σ increases from 1.2 to 1.5). To calculate the effect on the group size we use the formula: $N = 2 (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot \sigma^2 / d^2$. Alpha, power and the expected difference stay the same when using female mice or both sexes. The difference in number of animals needed when using only female mice or both sexes is therefore solely determined by the standard deviation. The fold increase of the groupsize when using both sexes is determined as follows: $\sigma_{\text{female+male}}^2 / \sigma_{\text{female}}^2 = 1.5^2 / 1.2^2 = 1.6$

When using both sexes throughout the project, the number of mice needed will increase based on the expected increase of the standard deviation to: $2560 \cdot 1.6 = 4000$ mice. Therefore, to reduce the total number of mice, we will use solely female mice.

On top of that, we prefer to use female mice over male mice, since they are easier to maintain in groups as they are less aggressive. When using males, this increases the likelihood of the need for individual housing of the animals for several weeks, which increases the discomfort.

Estimated number of animals

The maximum number of mice was calculated with a group size around 10 mice. For the first pilot we use 5 animals per group, to limit the use of animals when screening various conditions.

For the different research questions, the number of mice was estimated as follows:

For the first part, focusing on parenteral vaccination using particulate based vaccine formulations, we aim to establish the protection against pneumonia. To do this we need a model that results in pneumonia, but also enables us to study significant differences between vaccines. To do so, we will perform a pilot experiment to optimize dose, mouse species and bacterial strains that will be used in follow up experiments. 2 conditions per parameter will be examined, resulting in 8 different groups of 5 mice, making 40 mice in total. Table 1 shows an overview of this pilot experiment, with A and B representing the two different conditions of each parameter.

Subsequently, to optimize the timing of endpoint of the experiment a follow-up pilot experiment will be performed, including extra controls. Two conditions that showed promising result in the first pilot were tested again, using larger number of animals per group to enable statistically significant differences. This pilot will involve 6 groups of 10 animals, as shown in table 2.

In total these pilot experiments need 100 mice.

The optimal condition of the pilot experiments will be selected and used in the follow-up experiments. For each particle one formulation will be tested that resulted in a significant reduction in colonization in the vaccination-colonization model. This results in 3 experiments, with 6 groups of around 10 mice. Table 3 describes the animal groups that will be used in this experiment.

When performing this experiment three times, it makes a total of 180 mice.

For the second part, testing the efficacy of various prime boost strategies, solely the strategies that turned out to be effective against colonization will be evaluated. We expect to have 2 effective strategies in the colonization model. Therefore, this will result in maximally 2 experiments of 6 groups with 10 mice. Table 4 shows a representative experiment.

Performing this twice, 120 mice will be needed.

The total number of mice is: $100 + 180 + 120 = 400$

Table 1

Group no.	Exp. conditions			Number of mice
	Dose	Mouse species	Bact. Strain	
1	A	A	A	N=5
2	A	A	B	N=5
3	A	B	A	N=5
4	B	A	A	N=5
5	A	B	B	N=5
6	B	B	A	N=5
7	B	A	B	N=5
8	B	B	B	N=5
				Total = 40 mice

Table 2

Group no.	Exp. conditions	Number of mice
1	Neg. control: solvent only, termination 48 h	N=10
2	Neg. control: solvent only, termination 72 h	N=10
3	Condition 1, termination 48 h	N=10
4	Condition 1, termination 72 h	N=10
5	Condition 2, termination 48 h	N=10
6	Condition 2, termination 72 h	N=10
		Total = 60 mice

Table 3

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	Neg. control: solvent only	N=10
2	Neg. control: adjuvant only	N=10
3	Particle X	N=10
4	Particle X + adjuvant	N=10
5	Positive control	N=10
6	Positive control + adjuvant	N=10
		Total = 60 mice per experiment

Table 4

Group no.	Exp. condition	Number of mice
1	Neg. control: P+P+P solvent	N=10
2	Neg. control: I+I+I solvent	N=10
3	P+P+P particle X	N=10
4	I+I+I particle X	N=10
5	P+I+I particle X	N=10
6	I+P+P particle X	N=10
		Total = 60 mice per experiment

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse: C57BL/6, BALB/c	Registered breeding facility/supplier within EU	400	6-8 weeks

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 pneumonia cannot be studied *in vitro* and requires animal models. The mouse vaccination-pneumonia model is the most convenient small animal model that can be used to measure pneumonia.

Reduction

All vaccination strategies used in the vaccination-pneumonia model, will first be tested in the vaccination-colonization model. We will solely test strategies in the vaccination-pneumonia model that have shown to be effective in the colonization model. Thereby we reduce the number of animals used in this model to a minimum. Furthermore, will perform a pilot experiment to reduce the total number of animals needed in this model. In addition, we will not use more animals than the minimal amount that is needed to obtain statistically significant differences between the groups and we will reduce variation in results as much as possible in order to reduce spread and group size to a minimum.

Refinement

Since our aim is to study effects of vaccines in preventing pneumonia, these experiments cannot be performed without the induction of disease. We will monitor the mice carefully and reduce the discomfort to a minimum. To do so, we perform a pilot experiment that enables us to identify the optimal conditions with minimal discomfort. 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 mice will be monitored three times per day after the infection. This to monitor possible humane endpoints in time and remove animals from the experiment when necessary to minimize animal suffering. By monitoring the mice multiple times during day time, we detect suffering in time and prevent the need for monitoring during the night.

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?

G. Location where the animals procedures are performed

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

No analgesia will be used as this may interfere with the effectivity of the vaccination strategy used. We will try to reduce the discomfort for the mice to a minimum, by monitoring the mice carefully and setting the endpoint of the experiment at a time point when the mice will not reach the severe level of discomfort.

☐ 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 animals are likely to suffer from labored breathing and lose weight.

All animals will experience some discomfort caused by awakening from the inhalation anesthesia that is used to administer the infection inoculums intranasally. In 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.

Explain why these effects may emerge.

These adverse effects are caused by the development of pneumonia.
Some discomfort is caused by awakening from the inhalation anesthesia.

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

Since our aim is to study the protective effect of vaccination strategies on the development of pneumonia, these studies cannot be performed without the discomfort induced. During the development of pneumonia, mice will be monitored multiple times a day. The vaccination-pneumonia model has often been used in our lab. Temperature measurements with an infrared thermometer on the skin have been introduced by us and is used in case of doubts on the health status of the mice.

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.

Mice involved in the vaccination-pneumonia model will experience discomfort as we study the efficacy of vaccines in preventing disease. To prevent mice from severe suffering and reaching the pre-moribund state, we use the following criteria:

- Loss of body weight of more than 15% in 1-2 days or more than 20% from the start of the experiment.
 - Abnormal behavior, ruffled coat, hunched back and severe reduced mobility.
 - When a drop in temperature below 35°C is measured with an infrared thermometer on the skin (only will be measured in case of doubts on health status)
-

Indicate the likely incidence.

In the vaccination-pneumonia model mice are expected to develop disease. The severity depends on the virulence of the pathogen and the effectiveness of the host immune system to kill the pathogen. Based on the pilot experiment described in this animal procedure we will estimate the development of disease, and since we want to sacrifice the mice at the same time point, we will set the endpoint of the experiment at a time point the humane endpoint will not be reached. So we estimate the incidence for humane endpoint to be <10%. If the humane endpoint is reached this will

probably be on 20% weight loss since the most strains that we use are known to be rapidly cleared from the blood stream after intranasal infection and are only able to induce pneumonia in co-infection with influenza A virus.

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).

For the development of pneumonia, a moderate level of severity is estimated for all mice. We have set our humane endpoint in a way that mice will not reach a the severe level of discomfort, as described in paragraph 'J. Humane Endpoints'.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

End of experiment. We need to assess bacterial recovery in the nose and lungs, for that we need to harvest nasal and lung tissue.

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

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

☒ Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

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
AVD103002017904

Bijlagen

2

Datum 13 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 maart 2017. Het gaat om uw project "Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002017904. 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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

13 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017904

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
13 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017904

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
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]

Datum:
13 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017904

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? ☒ [x] 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: 12 april 2017
Geplande einddatum: 12 april 2022
Titel project: Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën voor preventie van pneumokokken infectie
Naam DEC: RU DEC 2016-0105
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- [x] Projectvoorstel
- [x] Beschrijving Dierproeven
- [x] Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- [x] DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:

Instantie voor dierenwelzijn

Plaats:

Nijmegen

Datum:

13 maart 2017

Datum:

13 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017904



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Grooteplein 29
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN
[REDACTED]

**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
AVD103002017904
Bijlagen
2

Datum 13 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 13 maart 2017

Vervaldatum: 12 april 2017

Factuurnummer: 170904

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: [REDACTED]

projectnummer: 2016-0105 Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002017904	€ 1.287,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

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
AVD103002017904

Datum 17 maart 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Combining parenteral and mucosal vaccination strategies against pneumococcal infection" met aanvraagnummer AVD103002017904. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In uw aanvraag beschrijft u verschillende stappen/fases in de experimentele opzet, maar duidelijke go/no-go momenten en besliscriteria om wel dan niet verder te gaan met het experiment of met een onderdeel van het experiment ontbreken. We verzoeken u om aan te geven of er momenten in de strategie zijn opgenomen wanneer u zal beslissen om niet verder met het experiment/een onderdeel van het experiment te gaan. Zo ja, welke besliscriteria worden toegepast?

Leges

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

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum:

17 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017904

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



Melding bijlagen

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

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD103002017904

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

☐ Projectvoorstel

☐ Beschrijving Dierproeven

☐ Niet-technische samenvatting

☐ Melding Machtiging

☐ Aanvraagformulier

☐

☐

☐

Datum:

17 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017904

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

Info-zbo (extern)

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 11 april 2017 16:15
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: leges en NTS aanvraag AVD103002017904

Geachte [REDACTED]

De CCD heeft uw aanvraag met nummer AVD103002017904 en titel 'Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection' besproken.

In de Niet-technische samenvatting staat onder punt 4.4 'dan zullen ze uit de proef gehaald worden'. Om verwarring te voorkomen, verzoeken we u de zin aan te passen met bijv. 'dan zullen ze gedood worden'.

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

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de nieuwe NTS en de leges hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

1-AVD103002017904-reactie-(21-03-2017)

Vraag CCD:

In uw aanvraag beschrijft u verschillende stappen/fases in de experimentele opzet, maar duidelijke go/no-go momenten en besliscriteria om wel dan niet verder te gaan met het experiment of met een onderdeel van het experiment ontbreken. We verzoeken u om aan te geven of er momenten in de strategie zijn opgenomen wanneer u zal beslissen om niet verder met het experiment/een onderdeel van het experiment te gaan. Zo ja, welke besliscriteria worden toegepast?

Antwoord:

Naar aanleiding van deze onduidelijkheid is bij paragraaf 3.4.2. van de project proposal een alinea toegevoegd over de go/no-go procedure en de criteria. Na elke fase zal bekeken worden of de geteste antigen delivery systems/vaccinatie routes voldoen aan het criterium om door te kunnen naar de volgende fase. Het criterium dat we hierbij gebruiken is:

Go: (gedeeltelijke) bescherming tegen de pneumokok

No-go: geen bescherming tegen de pneumokok.

Aangezien gestart wordt met een screening van de meerdere antigen delivery systems/vaccinatie routes, is het zeker dat een selectie hiervan alle fases beschreven in dit project zal doorlopen.

Ik hoop hiermee mijn verbeteringen in de CCD aanvraag voldoende te hebben toegelicht.

Met vriendelijke groet,



DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0105
2. Titel van het project: Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infections
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar nieuwe vaccinatiestrategieën voor preventie van pneumokokken infecties
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC: 24-01-2017
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☒ in vergadering besproken: 07-02-2017
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☒ termijnonderbreking(en) van 13-02-2017 tot 15-02-2017
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☒ aanpassing aanvraag: 20-02-2017
 - ☒ advies aan CCD: 10-03-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum vragen: 13-02-2017
 - Datum antwoorden: 20-02-2016
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-3.3: De relevantie van dit onderzoek is erg algemeen gesteld. Het belang voor de wetenschap is onderbelicht. De onderzoekers worden verzocht dit specifieker en uitgebreider toe te lichten.

Antwoord: Het belang voor de wetenschap, in het bijzonder de vermeerdering van kennis over de effecten van vaccin formulering en wijze van vaccineren (mucosaal en systemisch) is verder toegelicht. De verkregen kennis als resultaat van dit project is niet alleen van belang bij de ontwikkeling van vaccins tegen pneumokokken infecties. De strategieën die hier onderzocht worden zijn breder toepasbaar, wat betekent dat het kan bijdragen aan het verbeteren van vaccins tegen vele verschillende ziekteverwekkers.

Deze informatie is toegevoegd aan zowel het project proposal als de niet-technische samenvatting.

-3.4.1: De volgorde waarin de verschillende onderzoeksvragen worden onderzocht lijkt te verschillen tussen 3.2 en 3.4.1. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen dan wel te verduidelijken.

Antwoord: De volgorde van de project onderdelen, zoals genoemd onder 3.2 is aangepast zodat deze overeenkomt met de onderzoeksvragen gesteld in paragraaf 3.4.1. Deze aanpassing heeft geen verdere gevolgen op de volgorde van het geschreven project.

-3.4.1: Er worden modelantigenen gekozen in onderdeel 1. Op basis waarvan vindt deze keuze plaats? Hoeveel modelantigenen willen de onderzoekers testen en worden dezelfde modelantigenen vervolgens in de hele studie gebruikt?

Antwoord: We hebben gekozen voor twee modelantigenen, waarvan we op basis van onze eigen ervaring en informatie uit de literatuur weten dat deze antigenen (deels) bescherming bieden tegen infecties veroorzaakt door de pneumokok (K. Kuipers et al, Vaccine, 2015; 33(17), 2202-2209 & N. Kothari et al, Vaccine, 2015; 33(6), 783-788 & Z. Piao et al, Vaccine, 2014; 32(43), 5607-5613 & D.E. Briles et al, Vaccine, 1996; 14, 858-867). Deze modelantigenen zullen gedurende de gehele studie gebruikt worden als controle.

Description of animal procedures:

DAP1

-B: De onderzoekers vermelden dat het gebruik van beide geslachten vermeden dient te worden om de variatie te beperken, waardoor met kleinere groepen dieren kan worden gewerkt. Kunnen de onderzoekers dit onderbouwen met een (globale) berekening van het verschil in groeps grootte wanneer gemengde groepen gebruikt worden?

*Antwoord: Op basis van de literatuur is bekend dat mannetjes en vrouwtjes verschillend reageren op een pneumokokken infectie (Kadioglu et al, 2011). In de huidige literatuur met betrekking tot vaccine studies in muizen, worden veelal of mannetjes of vrouwtjes muizen gebruikt. Hierbij maakt de overgrote meerderheid van de studies gebruik van vrouwtjes muizen. Er is geen standaard deviatie bekend wanneer mannetjes en vrouwtjes muizen gecombineerd worden in één experiment. Aangezien er wel is bewezen dat het geslacht invloed heeft op de reactie op een pneumokokken infectie, nemen wij aan dat de standaard deviatie toeneemt zodra beiden geslachten worden gecombineerd. De volgende berekening toont aan dat een verhoging van de standaarddeviatie (σ van 1.2 naar 1.5) leidt tot een verhoging van het aantal benodigde dieren per experimentgroep. De volgende formule wordt hiervoor gebruikt: $N = 2 (Z \alpha/2 + Z\beta)^2 * \sigma^2/d^2$. Alpha, power en expected difference blijven in dit voorbeeld gelijk. Het verschil in aantal muizen tussen experimenten met alleen vrouwtjes muizen of beide geslachten wordt dus alleen bepaald door de standaarddeviatie. De factor waarmee de groeps grootte toe zal nemen bij gebruik van beide geslachten kan als volgt berekend worden: $\sigma^2_{female+male} / \sigma^2_{female} = 1.52/1.22 = 1.6$*

*Als we het gebruik van beide geslachten toepassen op het gehele project dan zal dit leiden tot het gebruik van: $2560 * 1.6 = 4000$ muizen. Om onnodig gebruik van muizen te voorkomen, beperken we ons daarom enkel tot vrouwtjes muizen.*

-Zoals het nu is verwoordt lijkt het alsof de onderzoekers verwachten dat alle mannen in groepshuisvesting gaan vechten waardoor zij enkele weken individueel gehuisvest moeten worden. De commissie verzoekt hen dit genuanceerder op te schrijven (ook in DAP2).

Antwoord: De bewoording is aangepast in zowel DAP1 als DAP2.

-I: De onderzoekers zullen het effect van immuunmodulators onderzoeken (in de tabellen is sprake van adjuvantia). Als er ongerief van adjuvantia en immunomodulators wordt verwacht dan dit graag vermelden (ook in DAP2).

Antwoord: Om verwarring te voorkomen is in het gehele document de term 'immune modulating molecules' vervangen door 'adjuvants'. We verwachten dat het toedienen van adjuvantia niet zal leiden tot een hoger ongerief.

DAP2

-K: Er worden geen middelen gegeven om benauwdheid te verlichten. Kunnen de onderzoekers een humaan eindpunt definiëren waardoor het ernstig ongerief wordt voorkomen?

Antwoord: Er is gekozen om geen middelen toe te dienen om de benauwdheid te voorkomen omdat dit mogelijk effect kan hebben op de infectie en daardoor op de te verkrijgen resultaten. De benauwdheid die kan optreden is een gevolg van ontsteking, wat gepaard gaat met symptomen zoals gewichtsverlies, verslechterde vachtverzorging, gebogen rug, verlaagde lichaamstemperatuur en verminderde mobiliteit. Zodra deze criteria worden waargenomen, zal de desbetreffende muis uit het experiment genomen worden, zoals ook beschreven onder 'J. Humane endpoints'. Ernstig ongerief wordt voorkomen door middel van evaluatie van de temperatuur, gewichtsverlies en gedrag van de muizen. Naar aanleiding hiervan is uit de NTS verwijderd dat <10% van de muizen ernstig ongerief zal ervaren, aangezien dit voorkomen zal worden.

Niet-technische samenvatting:

-3.5: Het percentage dieren dat ernstig ongerief zal ondergaan is niet vermeld.

Antwoord: Er wordt geen ernstig ongerief meer verwacht (zie antwoord op de vorige vraag).

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: Het wetenschappelijk belang van dit project is in meer detail toegelicht onder paragraaf 3.1 en 3.2 van de NTS, zoals dit eerder is aangepast in de project proposal.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
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. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project'. Het is niet mogelijk om de individuele onderzoeksvragen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel

binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC weet is er geen “tegenstrijdige” wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het ontwikkelen van vaccinatiestrategieën die resulteren in optimale bescherming tegen *Streptococcus pneumoniae* in muismodellen. Het uiteindelijke doel is te komen tot betere bescherming tegen *S. pneumoniae* in de bevolking. De aanvrager zal het effect van verschillende toedieningroutes (mucosaal en parenteraal) en van verschillende vaccinatieprotocollen met ‘deeltjesvaccins’ op lokale en systemische immuniteit onderzoeken bij muizen met behulp van enkele (model) Pneumococcus antigenen. Het is aannemelijk dat de inzichten uit dit onderzoek zullen bijdragen aan de ontwikkeling van effectievere vaccinatiestrategieën voor *S. pneumoniae* bij mensen. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project een directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project daaraan zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van effectieve vaccinatiestrategieën met antigenen in deeltjesvorm op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van optimale vaccinatiestrategieën tegen de meerderheid van de circulerende pneumokokken stammen, en dat er behoefte is aan effectievere vaccins die brede bescherming bieden tegen alle serotypen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Voor de bevolking/patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan het voorkomen van ziekte, hetgeen een verbetering van kwaliteit van leven betekent. Gerichte vaccinatie op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere bescherming tegen *S. pneumoniae*. Dit kan er toe leiden dat minder mensen last hebben van ernstige infecties met *S.*

pneumoniae. Met name in ontwikkelingslanden zal hierdoor het aantal kinderen dat sterft aan een longontsteking sterk kunnen dalen. Kunnen beschikken over adequate vaccinaties om ernstige ziekten te voorkomen is van groot belang voor de samenleving.

6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
 - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
 - ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - ☐ Zwerfdieren (10h)
 - ☐ Hergebruik (1e lid 2)
 - ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De meeste proeven worden gedaan met een mild infectiemodel, waarin het ongerief voor de dieren licht is. Om te onderzoeken of de meest veelbelovende vaccinatiestrategieën bescherming bieden tegen longontsteking wordt een model gehanteerd waarin longontsteking ontstaat. Door frequente controles en het zorgvuldig toepassen van humane eindpunten wordt ernstig ongerief voor deze dieren voorkomen, waardoor het ongerief voor de dieren beperkt blijft tot matig.
12. De integriteit van dieren wordt in beperkte mate aangetast door deze experimenten. De challenge experimenten waarin wordt onderzocht of de vaccinatiestrategieën bescherming bieden tegen longontsteking, veroorzaken in de eerste plaats ziekte en ongerief bij een deel van de dieren, maar ook hun gedrag en zelfredzaamheid worden daardoor onvermijdelijk beïnvloed.

13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van eerdere ervaring ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten. De humane eindpunten worden toegepast om ernstig ongerief voor de dieren te vermijden.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderdelen van het project die *in vitro* bestudeerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk. Het effect van vaccinatiestrategieën kan niet goed zonder proefdieren onderzocht worden, omdat meerdere organen en celtypen betrokken zijn bij de werking van het immuunsysteem.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksofzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven of pilots worden gebruikt voor het design van vervolgexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Waar mogelijk gebruiken de onderzoekers een mild infectiemodel waarbij de dieren niet ziek worden. Wanneer het effect van vaccinatie op longontsteking wordt bestudeerd, wordt het laatste meetpunt zodanig gekozen dat de dieren nog niet ernstig ziek zijn. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: "In de literatuur zijn sexe-gerelateerde verschillen in vatbaarheid voor infecties met pneumokokken beschreven. Gebruik van beide sexen leidt dus tot grotere spreiding in de resultaten, waardoor er meer dieren nodig zijn om een bepaalde effectgrootte te kunnen aantonen." De aanvrager laat op basis van een realistische aanname over de toename van de spreiding zien, dat het om een zeer groot aantal extra dieren gaat. De onderzoekers geven de voorkeur aan vrouwelijke dieren omdat deze makkelijker in groepen gehouden kunnen worden. Individuele huisvesting van mannelijke dieren die niet in groepen gehouden kunnen worden geeft extra ongerief voor deze dieren. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke of vrouwelijke dieren uit te voeren. Zij is het eens met de keuze voor vrouwelijke dieren.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn

2010/63/EU.

20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

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

2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.

Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Pneumokokken kunnen ernstige infecties veroorzaken zoals longontsteking, meningitis, bloedvergiftiging en middenoorontsteking. Met name jonge kinderen, ouderen en mensen met verminderde afweer kunnen hier zeer ziek van worden of zelfs overlijden. In ontwikkelingslanden is longontsteking – meestal veroorzaakt door een infectie met pneumokokken - doodsoorzaak nummer één van kinderen onder de vijf jaar. De huidige vaccins tegen deze ziekteverwekker geven geen bescherming tegen alle serotypen, waardoor er steeds een herleving is van pathogene serotypes. De ontwikkeling van een effectief vaccin dat brede bescherming biedt, zal resulteren in minder ziekte en sterfte door pneumokokken. Bovendien zullen de resultaten van dit onderzoek ook gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van vaccins tegen andere ziekteverwekkers. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van effectievere vaccins tegen pneumokokken van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van vaccinatiestrategieën die resulteren in optimale bescherming tegen *Streptococcus pneumoniae* in muismodellen. Het uiteindelijke doel daarvan is te komen tot betere bescherming tegen *S. pneumoniae* in de bevolking. De DEC is van mening dat de belangen van de bevolking/patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

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

AVD103002017904

Bijlagen

1

Datum 13 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 13 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection" met aanvraagnummer AVD103002017904. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 maart en 12 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de go/no-go momenten van uw project beschreven en de Niet-technische samenvatting tekstueel aangepast.

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.

Met het oog op artikel 10a1, lid 2, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection" starten. De vergunning wordt afgegeven van 13 april 2017 tot en met 12 april 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC 2016-0105 gevoegd. Dit advies is opgesteld op 10 maart 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de

Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:
13 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017904

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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 april 2017 tot en met 12 april 2022, voor het project "Combining parenteral and mucosal vaccinationstrategies against pneumococcal infection" met aanvraagnummer AVD103002017904, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC 2016-0105. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 april 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 10 maart 2017, ontvangen op 13 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 21 maart en 12 april 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Vaccination-colonization model				
	Muizen (Mus musculus) /	2.160	100% Licht	
3.4.4.2 Vaccination-pneumonia model				
	Muizen (Mus musculus) /	400	100% Matig	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

Aanvraagnummer:

AVD103002017904

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

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



Aanvraagnummer:
AVD103002017904

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Aanvraagnummer:

AVD103002017904

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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.