

Inventaris Wob-verzoek W21-04									
14508									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier (postversie), d.d. 11-2-2021				x		x	x	
2	Project Proposal versie 1, d.d. 18-2-2021				x		x	x	
3	Appendix 1 versie 1, d.d. 18-2-2021				x			x	
4	Appendix 2 versie 1, d.d. 18-2-2021				x		x	x	
5	Ontvangstbevestiging, d.d. 18-2-2021				x		x	x	
6	DEC-advies				x			x	
7	E-mail van CCD aan VGH inzake aanvullende vragen, d.d. 24-3-2021				x		x	x	
8	E-mail van VGH aan CCD inzake repliek op vragen, d.d. 24-3-2021				x		x	x	
9	Interne e-mail CCD, inzake antwoorden van VGH, d.d. 24-3-2021				x		x	x	x
10	E-mail van CCD aan VGH inzake aanvullende vragen, d.d. 24-3-2021				x		x	x	
11	Formele brief van VGH aan CCD inzake repliek op vragen, d.d. 24-3-2021				x		x	x	
12	Project Proposal versie 2, d.d. 24-3-2021				x		x	x	
13	Appendix 1 versie 2, d.d. 24-3-2021				x		x	x	
14	Appendix 2 versie 2, d.d. 24-3-2021				x		x	x	
15	Interne Advies Nota CCD, d.d. 24-3-2021				x		x	x	x
16	E-mail CCD aan VGH inzake verdere opvolging, d.d. 29-3-2021				x		x	x	
17	E-mail CCD aan VGH inzake verdere opvolging, d.d. 29-3-2021				x		x	x	
18	E-mail CCD aan VGH inzake betaling leges, d.d. 6-4-2021				x		x	x	
19	E-mail VGH aan CCD inzake betaling leges, d.d. 6-4-2021				x		x	x	
20	E-mail CCD aan VGH inzake betaling leges, d.d. 6-4-2021				x		x	x	
21	E-mail VGH aan CCD inzake betaling leges, d.d. 8-4-2021				x		x	x	
22	Interne e-mail CCD inzake registratie nieuwe aanvraag, d.d. 12-4-2021				x		x	x	
23	E-mail CCD aan VGH inzake betaling leges, d.d. 12-4-2021				x		x	x	
24	Interne e-mail CCD inzake ondertekening beschikking, d.d. 13-4-2021				x		x	x	
25	Beschikking, d.d. 12-4-2021				x		x	x	
26	Begeleidende e-mail CCD aan VGH inzake de beschikking, d.d. 13-4-2021				x		x	x	
27	Aanvullende e-mail CCD aan VGH inzake de beschikking, d.d. 14-4-2021				x		x	x	
28	Terugkoppeling per e-mail van CCD aan DEC, d.d. 18-5-2021				x		x	x	
29	NTS	x							



14508

### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

#### Administratieve gegevens

11 FEB 2021

- 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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), of in de toelichting op de website.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1

#### Gegevens aanvrager

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

- Ja > Vul uw deelnemernummer in **10.2.g**
- Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3
- Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1
- Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2

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

Naam instelling of organisatie	10.2.g			
Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
	10.2.e			
E-mailadres contactpersoon	10.2.e			
	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)				
E-mailadres gemachtigde				

Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer	10.2.g			
Postcode en plaats	10.2.g			
Postbus, postcode en plaats	10.2.g			

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	10.2.e	
Afdeling	Virologie	

1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	Telefoonnummer	10.2.e
		E-mailadres	10.2.e
		(Titel) Naam en voorletters	10.2.e <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	10.2.e
		Afdeling	Virologie
		Telefoonnummer	10.2.e
		E-mailadres	10.2.e
		(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

## 2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3  <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3  <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01 - 08 - 2021
		Einddatum (t/m)	01 - 08 - 2026
3.2	Wat is de titel van het project?	Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?		
3.4		Naam DEC	10.2.g
		Postadres	

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

E-mailadres

10.2.g

#### 4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:	Afdeling:	
Straat:	Huisnummer:	
Postcode:	Plaats:	
Postbus:	Postcode:	Plaats:
E-mail:		
Ordernummer:		

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

#### 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel      Aantal bijlage(n) dierproeven 2
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging
- 

#### 6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C 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	10.2.e
Functie	
Plaats	10.2.g
Datum	09 - 02 - 2021
Handtekening	10.2.e





## Formulier Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

10.2.g

Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project?

*U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Human respiratory syncytial virus (RSV) is the commonest cause of lower respiratory tract infection (LRTI) in children, worldwide, causing disease in an estimated 34 million children, >3 million hospitalisations, and 66,000–199,000 deaths in children under 5 years, each year (1). The majority of deaths occur in low- and middle-income countries (1, 2). Most children are infected during the

first year of life, and all have been infected by their second year. Although there is limited viral antigenic variation, the duration of immunity induced by RSV is short-lived and recurrent infections occur throughout life (3). The peak incidence of severe disease is in infants 2–7 months of age. Moreover, RSV infection in infancy is also associated with the subsequent development of chronic respiratory morbidity (e.g., asthma, wheezing) (4). Because RSV immunity is short-lived, repeated infections occur throughout life. Besides children, RSV also contributes to excess mortality in the elderly (5, 6) and in immunosuppressed individuals of any age (7). Few epidemiological data on RSV infections are available in adults, but it is estimated to cause up to 5% of community-acquired pneumonia, mainly in older adults and those with co-morbidities in whom a 9 to 12% case fatality rate is observed (8, 9). The economic impact of RSV disease in adults is estimated to be greater than that of influenza in relation to numbers of days lost from work (10, 11). There is no licensed RSV vaccine and only one effective anti-viral therapy (monoclonal antibody). The availability of an effective RSV vaccine would reduce the impact of RSV infections in the target groups and contribute to public health. An alternative strategy to protect neonates from RSV infection is vaccination of pregnant women. Therefore RSV vaccine candidates are being developed for three main target groups: infants and toddlers (6 mo to 5 yrs), pregnant women and the elderly.

The name Respiratory Syncytial Virus is derived from an effect mediated by the viral F protein, causing membrane fusion with virus infected and neighbouring cells forming so-called syncytia. RSV is a negative-sense, single-stranded RNA virus of the family Pneumoviridae. Two antigenic subgroups of RSV are known A and B, with subgroup A being responsible for severe clinical cases and subgroup B with asymptomatic cases. The RSV genome is approximately 15 k base-pairs, with 10 genes encoding a total of 11 proteins (12). Of these proteins the F protein (fusion), expressed on the virus surface, is pursued as a vaccine antigen. The F protein exists in two distinct conformations: pre- and post-fusion, but only the pre-fusion conformation is able to induce potent neutralising antibodies. The F protein amino acid sequence is relatively conserved and, unlike influenza, does not require frequent antigenic updating. The second surface-expressed protein is G, which is involved in initial virus attachment, it is highly variable and appears to be non-essential, as viruses without it only have an attenuated phenotype. Therefore, the G protein is not considered as a vaccine antigen. Besides the viral surface antigen F which aims at inducing neutralising antibodies, the conserved nucleo- (N) or matrix-proteins could be considered for cell-mediated immunity inducing vaccines.

The fact that neither natural (13) nor experimental human infection (3) induces robust immunity against reinfection, implies that a RSV vaccine is expected to prevent severe disease, rather than provide sterilising immunity. Passive immunisation with Palivizumab, a humanised mouse monoclonal antibody directed against the RSV pre-fusion F protein, is the only treatment option for severe RSV infection (14), as no RSV vaccines currently are available. Palivizumab has a relatively short half-life (about 20 days), and thus, monthly intramuscular injections are required during the RSV season to provide protection. It is also expensive, thus limiting its use to very high risk individuals (e.g., those born extremely prematurely with chronic lung disease of infancy or infants with major congenital cardiac disease) in high-income countries (15).

RSV vaccine development has been hampered by historical results obtained in the late 1960's with formalin-inactivated (FI) RSV vaccines, which increased the risk of severe RSV infection in children (16). This failure is likely due to absence of pre-fusion F protein in FI-RSV vaccines, with the remaining post-fusion F protein inducing only poorly neutralising Ab (17). Moreover, FI-RSV vaccines induce an undesired, potentially dangerous, Th2-biased response (18, 19). Recent advances in structural biology have led to the development of RSV-F protein antigens that are stabilised in the pre-fusion configuration (20, 21) and numerous RSV vaccine candidates are being clinically tested (22).

Cotton rats and mice are widely used as models of RSV infection and have provided insights into mechanisms of immunity to and the pathogenesis of RSV infections. Although cotton rats are semi-permissive for virus replication, they are about 100-fold more permissive than BALB/c mice per inoculum dose of virus, but they do not develop clinical signs of disease (23). Following IN inoculation, RSV replicates to high titres in the nose and lungs, but to lower titres in the trachea. Cotton rats are susceptible to infection throughout life, but virus replication is greater and persists for longer in the nasal passages of 3 day-old rats than in older animals (24, 25). Ferrets can also be used for the study of RSV infection, but only few reports have hitherto been published (26). Bovine RSV (BRV) in young calves is an alternative model for epidemiology, pathogenesis and vaccine efficacy studies (27). A recent review

provides information on RSV infections in Non-Human Primates (NHPs) (27). *Orangutans (Pongo spp.)* (27), *gorilla (Gorilla gorilla)* (27), *chimpanzee (Pan troglodytes)* (27), *bonnet macaques (Macaca radiata)* and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) (18, 30) are all semi-permissive for human RSV infection. Infant, young and adult macaques are all equally sensitive to RSV infection and mount local and systemic immune responses that protects from re-infection (30).

Of the different animal models used in RSV vaccine research, only NHPs have a unique close homology to humans in most components of their immune system (31-33). For instance, similar T and B-cell subsets have been described in NHPs (33). Moreover, the immunoglobulin gene germline repertoire is highly conserved between macaques and humans, which is important when induction of broadly neutralizing antibodies (34, 35). In addition, structure and function of Fc receptors, which are essential for the function of non-neutralizing antibodies, show many homologies between macaques and humans (36). Only very limited information is available on Fc receptors in ferrets or cotton rats and only few reagents for the in-depth analysis of immune responses are available (37). Finally, in NHPs the innate immune system, including molecular pathways and antigen presenting cell subsets, are much more homologous to humans than what is seen in mice (31). NHPs not only most closely reflect the human physiology, but also resemble humans in their clinical symptoms, limited pathology, pattern of viral replication and cytokine and chemokine responses following RSV infection (30). In conclusion, the strong immunological and physiological resemblances to humans make NHPs a unique model in pre-clinical safety, immunogenicity and efficacy evaluation of RSV vaccines.

### 3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

The main objective of this proposal is to evaluate novel RSV vaccine candidates for safety, immunogenicity and protective efficacy following RS-virus infection in macaques. The capacity of new vaccine candidates to elicit durable neutralising immune responses will be evaluated under this project application. The ultimate objective of this project is to develop a RSV vaccine that induces durable protective responses against RSV infection. Vaccines that will be tested in NHP have to be in the final stages of preclinical development and require this final validation step in order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species and that they are effective in an animal species that has an immune system closely related to humans.

The project has two objectives: 1. To evaluate novel RSV vaccine candidates for safety, immunogenicity and protective efficacy following RS-virus infection in macaques using the established RSV-macaque infection model and 2. Establishment of novel RSV infection models using a different challenge strain or route of infection.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

At our institute we have been performing vaccine evaluation studies in NHP for over 20 years. Most vaccine candidates were directed against human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and tuberculosis. Since 2012 we have been working on influenza virus infection in macaques and the evaluation of vaccines against influenza (38-43). We have the appropriate facilities and experience to work with pathogenic viruses, including influenza virus, at DM-3 and ML-3 biosafety conditions. In addition, we have the appropriate immunological assays for assessment of cellular, humoral and innate immune responses against influenza. Our long-standing experience with pathogenic viruses, including influenza, and with vaccine evaluation guarantees that the animal studies describe in this proposal will be adequately performed. RSV vaccine evaluation studies at 10.2g will be performed in close collaboration with two institutes who have extensive experience in the RSV infection model.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.



### 3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Annual RSV epidemics cause considerable morbidity and mortality world-wide and especially affect more vulnerable groups like young children, the elderly and people with underlying diseases. In addition, pregnant women are also considered as RSV vaccine recipients, where trans-placental IgG can confer protection in neonates. The economic impact of RSV disease in adults is estimated to be greater than that of influenza in relation to numbers of days lost from work (10, 11). Currently no RSV vaccines are available and a RSV vaccine that induces durable protection against RSV will contribute to a reduction of RSV morbidity and mortality in (young) children and risk-groups. Thus, a vaccine that confers durable protection against RSV would have great societal impact. Both novel vaccines, for instance in the form of DNA, mRNA or viral vectors, as well as new vaccine delivery methods require evaluation in appropriate animal models so that the level as well as the mechanism of protection can be adequately established, before these new vaccines can be evaluated in clinical studies.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

The stakeholders for an RSV vaccine are the aforementioned target groups (young children, pregnant women, people with underlying diseases and the elderly) for whom protection from RSV infection would increase their quality of life. The vaccination of risk-groups and the resulting decrease in RSV burden would also be of great societal benefit. For the animals as stakeholders, there are no direct benefits and they will experience moderate discomfort as a result of the experimental procedures.

### 3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en beslisriteria.

Annual RSV epidemics cause considerable morbidity and mortality world-wide and especially affect more vulnerable groups like young children, the elderly and people with underlying diseases. In addition, pregnant women are also considered as RSV vaccine recipients, where trans-placental IgG can confer protection in new-borns. The economic impact of RSV disease in adults is estimated to be greater than that of influenza in relation to numbers of days lost from work (10, 11). Currently no RSV vaccines are available and an RSV vaccine that induces durable protection against RSV will contribute to a reduction of RSV morbidity and mortality in (young) children and risk-groups. Thus, a vaccine that confers durable protection against RSV would have great societal impact. Both novel vaccines, for instance in the form of DNA, mRNA or viral vectors, as well as new vaccine delivery methods require evaluation in appropriate animal models so that the level as well as the mechanism of protection can be adequately established, before these new vaccines can be evaluated in clinical studies.

#### 3.4 Research strategy

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

The criteria to consider vaccine candidates for evaluation are: a) the vaccine strategy must be novel, for instance with regards to choice of antigen, formulation, route of application, that have not been tested before in similar NHPs studies, b) demonstration that the vaccine or vaccine components are non-toxic, c) when specific host molecules are targeted then cross recognition of macaque homologues must have been demonstrated, d) the vaccine cannot be adequately tested in other than NHP animal models, for instance due to the mechanism of action or the type of immunological assessment needed, e) preferably immunogenicity of vaccine candidates should have been proven in other species, unless this is not possible because the specific vaccine modality used does not work in other species. This concerns only vaccines for which it is not possible to directly evaluate them in other species because interaction with specific host molecules is required that are only present in humans and in NHPs, but not in other species. In this case, we would like to add the additional requirement that for this type of vaccine a similar vaccine strategy that targets slightly different molecules but uses the same mode of action has been evaluated and found to be immunogenic in other species.



In order to evaluate the safety and immunogenicity of the vaccine concept, a vaccine evaluation experiment will be performed according to well established procedures, as described in appendix 1. Typically, one or a number of immunisations are given over a certain time period. Following immunisation induction of T-cell and antibody immune responses are measured, systemically in the blood as well as locally in the upper and lower respiratory tract. The strength of these responses as well as their duration are determined. Subsequently, the capacity of the vaccine to protect against infection is evaluated by experimental infection of the animals with RSV. For RSV infection we will use a macaque adapted RSV strain (18, 29), shown to be infectious in macaques.

Experimental infection will only be performed when the immunisation has induced immune responses against the virus that is to be used for experimental infection, such that protection against infection is to be expected. Whether protection is actually achieved depends on local interaction between cells of the immune system and local anti-viral antibodies with the virus and virus infected cells in the respiratory tract. This cannot be adequately modelled in an in vitro system and requires experimental infection of an animal. Ideally the vaccine should provide a robust level of protection and be able to reduce disease and virus replication in animals infected with a standard virus dose via delivery to the upper respiratory tract and lungs. However, since most people become infected via exposure to small droplets containing a limited amount of virus, a less stringent infection model; i.e. using a low dose of virus given via aerosol delivery, may sometimes be chosen. In the event evaluation of the capacity of a vaccine to protect against infection requires that a virus has to be used that has not been tested before in macaques, then this virus will first be tested in a small number of animals to determine if all animals become infected and what the amount of virus replication is (appendix 2). Virus infection is routinely performed by inoculating the animals via a number of routes or combinations thereof; i.e. intra-tracheal, oral or intranasal, using a standard virus dose. For refinement, we will investigate another mode of virus delivery, namely as an aerosol. The rationale for setting up this model of infection is that the virus is given in the form of small droplets that better reflect the natural mode of exposure. Once this method is established for RSV infection, it can be applied in subsequent vaccine evaluation studies, for instance in cases where less stringent criteria of protection against infection are needed (in case it is difficult to make a protective vaccine and it is necessary to establish relatively modest improvements in vaccine development that can only be measured when a low dose of virus is used).

#### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

The main objective can be divided in 2 sub- objectives:

Vaccine evaluation: Safety, immunogenicity and capacity to protect against infection will be evaluated using an established RSV infection model. The challenge virus to be used in the initial vaccine efficacy studies is a, well described, macaque-adapted human RSV isolate, shown to reproducibly infect macaques (18, 29).

Establishment of a new RSV infection model: In the event a new RSV strain is required for vaccine evaluation, the infection model will be optimised for dose and route of administration (e.g. i.t., oral, i.n. or aerosol delivery) in order to optimally assess vaccine efficacy. When aerosol administration for the macaque-adapted RSV challenge strain the challenge dose will have to be established.

In the event that the established macaque-adapted RSV challenge model will be used, this can be performed under sub-objective 1. If, however, a new challenge virus has to be used for vaccine evaluation, two steps are required: The infection model has to be established (sub-objective 2), before the vaccine can be evaluated. Therefore, two types of experiments are required to fulfil these objectives: 1. Vaccine evaluation experiments (described in appendix 1) and 2. Establishment of a new RSV challenge model (described in appendix 2).

#### *Vaccine evaluation in macaques.*

For this type of experiment animals will be immunised by a number of immunisations over a defined time period. During the study animals will be monitored for adverse effects of the vaccine, including monitoring of general behaviour and health. Blood, nasal washes and bronchoalveolar lavages will be collected to determine induction of systemic as well as local immune responses. Only if immune responses, suggesting protection against infection, are induced the efficacy will be tested by experimental infection with RSV. A group of control animals will be included for comparison. This control

group can be unvaccinated, or be previously infected (e.g. RSV). The choice of the control groups depends on the research question.

#### *RSV infection in macaques.*

In order to establish infectivity and potential pathogenicity of a virus that has not been tested previously in NHP, a small number of animals will be infected and monitored for clinical symptoms, fever, body weight and changes in blood parameters. Nasal and tracheal swabs and lung lavages will be taken to confirm that the animals were infected and to determine virus replication. To evaluate a new virus or a different infection route, the virus is inoculated via the desired route, using a standard virus dose. Proper application in vaccine evaluation requires that in these infection studies > 80% of the animals become infected and that the amount of virus produced in the respiratory tract over the infection period is clearly detectable and that the variation between the animals is sufficiently low to allow measurement of reduction in virus load in vaccinated animals with less than 10 animals per group. In case these parameters are not achieved, the experiment will be repeated with a 10-100 times higher dose. In case any of the animals reaches the humane endpoint within the first four days after infection then a 10-100 times lower virus dose will be evaluated. The same criteria will be applied to determine whether the aerosol infection model is sufficiently robust.

#### 3.4.3 Benoem de type dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	RSV vaccine evaluation in macaques
2	RSV infection in macaques

#### Referenties

1. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9725):1545-55.
2. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet*. 2017.
3. Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*. 1991;163(4):693-8.
4. Fauroux B, Simoes EAF, Checchia PA, Paes B, Figueras-Aloy J, Manzoni P, et al. The Burden and Long-term Respiratory Morbidity Associated with Respiratory Syncytial Virus Infection in Early Childhood. *Infect Dis Ther*. 2017;6(2):173-97.
5. Falsey AR, Walsh EE. Viral pneumonia in older adults. *Clin Infect Dis*. 2006;42(4):518-24.
6. Hall CB, Simoes EA, Anderson LJ. Clinical and epidemiologic features of respiratory syncytial virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;372:39-57.
7. Chemaly RF, Shah DP, Boeckh MJ. Management of respiratory viral infections in hematopoietic cell transplant recipients and patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis*. 2014;59 Suppl 5:S344-51.
8. Lee N, Lui GC, Wong KT, Li TC, Tse EC, Chan JY, et al. High morbidity and mortality in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections. *Clin Infect Dis*. 2013;57(8):1069-77.
9. Malosh RE, Martin ET, Callear AP, Petrie JG, Lauring AS, Lamerato L, et al. Respiratory syncytial virus hospitalization in middle-aged and older adults. *J Clin Virol*. 2017;96:37-43.
10. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1749-59.
11. Fleming DM, Elliot AJ. Respiratory syncytial virus: a sleeping giant? *The European respiratory journal*. 2007;30(6):1029-31.
12. Lee WJ, Kim YJ, Kim DW, Lee HS, Lee HY, Kim K. Complete genome sequence of human respiratory syncytial virus genotype A with a 72-nucleotide duplication in the attachment protein G gene. *J Virol*. 2012;86(24):13810-1.

13. Henderson FW, Collier AM, Clyde WA, Jr., Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med.* 1979;300(10):530-4.
14. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The Impact-RSV Study Group. *Pediatrics.* 1998;102(3 Pt 1):531-7.
15. PHE. Green Book, Chapter 27a Respiratory Syncytial Virus [Available from: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/458469/Green\\_Book\\_Chapter\\_27a\\_v2\\_OW.PDF](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/458469/Green_Book_Chapter_27a_v2_OW.PDF).
16. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol.* 1969;89:422-34.
17. Killikelly AM, Kanekiyo M, Graham BS. Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus. *Sci Rep.* 2016;6:34108.
18. De Swart RL, Kuiken T, Timmerman HH, van Amerongen G, Van Den Hoogen BG, Vos HW, et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) induces interleukin-13-associated hypersensitivity to subsequent RSV infection. *J Virol.* 2002;76(22):11561-9.
19. Moghaddam A, Olszewska W, Wang B, Tregoning JS, Helson R, Sattentau QJ, et al. A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines. *Nat Med.* 2006;12(8):905-7.
20. McLellan JS, Chen M, Joyce MG, Sastry M, Stewart-Jones GB, Yang Y, et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science.* 2013;342(6158):592-8.
21. McLellan JS, Chen M, Leung S, Graepel KW, Du X, Yang Y, et al. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science.* 2013;340(6136):1113-7.
22. PATH. RSV vaccine snapshot [Available from: <https://www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/>.
23. Byrd LG, Prince GA. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Clin Infect Dis.* 1997;25(6):1363-8.
24. Prince GA, Jenson AB, Horswood RL, Camargo E, Chanock RM. The pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *Am J Pathol.* 1978;93(3):771-91.
25. Lemon K, Nguyen DT, Ludlow M, Rennick LJ, Yuksel S, van Amerongen G, et al. Recombinant subgroup B human respiratory syncytial virus expressing enhanced green fluorescent protein efficiently replicates in primary human cells and is virulent in cotton rats. *J Virol.* 2015;89(5):2849-56.
26. Stittelaar KJ, de Waal L, van Amerongen G, Veldhuis Kroeze EJ, Fraaij PL, van Baalen CA, et al. Ferrets as a Novel Animal Model for Studying Human Respiratory Syncytial Virus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Hosts. *Viruses.* 2016;8(6).
27. Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine.* 2017;35:469-80.
28. Ispas G, Koul A, Verbeeck J, Sheehan J, Sanders-Beer B, Roymans D, et al. Antiviral Activity of TMC353121, a Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Inhibitor, in a Non-Human Primate Model. *PLoS One.* 2015;10:e0126959.
29. Grunwald T, Tenbusch M, Schulte R, Raue K, Wolf H, Hannaman D, et al. Novel vaccine regimen elicits strong airway immune responses and control of respiratory syncytial virus in nonhuman primates. *J Virol.* 2014;88:3997-4007.
30. Grandin C, Lucas-Hourani M, Clavel M, Taborik F, Vabret A, Tangy F, et al. Evidence for an intranasal immune response to human respiratory syncytial virus infection in cynomolgus macaques. *J Gen Virol.* 2015;96:782-92.
31. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 2004;172(5):2731-8.
32. Jacobsen FW, Padaki R, Morris AE, Aldrich TL, Armitage RJ, Allen MJ, et al. Molecular and functional characterization of cynomolgus monkey IgG subclasses. *J Immunol.* 2011;186:341-9.
33. Demberg T, Robert-Guroff M. B-Cells and the Use of Non-Human Primates for Evaluation of HIV Vaccine Candidates. *Curr HIV Res.* 2015;13(6):462-78.
34. Link JM, Hellinger MA, Schroeder HW, Jr. The Rhesus monkey immunoglobulin IGHD and IGHJ germline repertoire. *Immunogenetics.* 2002;54:240-50.

35. Sundling C, Li Y, Huynh N, Poulsen C, Wilson R, O'Dell S, et al. High-resolution definition of vaccine-elicited B cell responses against the HIV primary receptor binding site. *Sci Transl Med*. 2012;4(142):142ra96.
36. Hogarth PM, Anania JC, Wines BD. The FcγR1 of humans and non-human primates and their interaction with IgG: implications for induction of inflammation, resistance to infection and the use of therapeutic monoclonal antibodies. *CurrTopMicrobiolImmunol*. 2014;382:321-52.
37. Albrecht RA, Liu WC, Sant AJ, Tompkins SM, Pekosz A, Meliopoulos V, et al. Moving Forward: Recent Developments for the Ferret Biomedical Research Model. *mBio*. 2018;9(4).
38. 10.2.e [REDACTED]
39. 10.2.e [REDACTED]
40. 10.2.e [REDACTED]
41. 10.2.e [REDACTED]
42. Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, Wagner MV, Zhu X, Hoffman RM, et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science*. 2015;349:1301-6.
43. 10.2.e [REDACTED]





## Appendix Description animal procedures

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

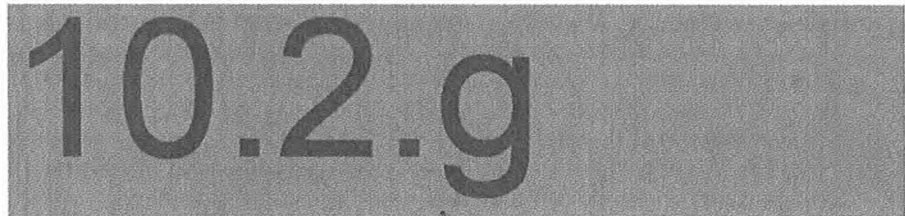
### 1 General information

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

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 List the serial number and type of animal procedure

*Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.*



Serial number	Type of animal procedure
1	RSV vaccine evaluation in macaques

### 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.

We have developed a general study protocol for the evaluation of RSV vaccines in macaques. Typically a recording device is surgically placed in the abdominal cavity before the start of the study to retrospectively evaluate body temperature (measured every 15 minutes) and/or heart rate, respiration and activity. Subsequently the animals are immunised either once or receive a number of immunisations over a certain time period. Although the vaccines to be used in these studies have already been extensively evaluated in other animals and therefore are expected to give no or only very limited adverse effects, macaques will be monitored for possible changes in general behaviour and health. The immunisation site will be inspected for local reactions and blood will be drawn to measure clinical chemistry and haematology parameters. Before, between and after immunisations, blood and occasionally nasal samples (either swabs or washes) or lung lavages will be collected to measure induction of systemic as well as local immune responses. Both T-cell and antibody responses will be determined against several RSV antigens in order to establish the strength and durability of the ensuing immune response. When adequate immune responses are induced that indicate that protection against infection might be achieved, the efficacy against infection will be tested by experimental infection with RSV. Whether an immune response is adequate depends on the nature of the vaccine under investigation; for antibody responses this can be assessed by comparison with data obtained in clinical trials, whereas for cell-mediated immune responses on few data are available and adequacy of the response will be assessed by comparison with published data where possible. A group of non-vaccinated animals will be included as infection controls. In addition, a group of RSV infected animals may also be included, such that the vaccine under evaluation can be compared with natural RSV infection. We will use a well-established RSV infection model using a macaque-adapted human RSV strain, as described in appendix 2 (1-3). In the event, the vaccine candidate requires testing with a different RSV strain, or aerosol-infection, the infection model will be established at 10.2.g as described in appendix 2. All animals in a specific vaccine group will be challenged with the same virus as described in appendix 2.

The primary outcome parameters are: absence of unexpected reactogenicity of the vaccine; effects of the vaccine on general behaviour, health, local reactions and blood parameters. Immunogenicity: induction of cellular and humoral immune responses. The type and strength of the induced responses will determine if the objectives of the vaccine strategy are achieved and whether immune responses are sufficiently strong to proceed with viral challenge. Efficacy: capacity to protect against viral challenge will be established in terms of: reduction in clinical symptoms, fever, virus replication and changes in blood parameters.

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

A recording device is surgically placed in the abdominal cavity at least 4 weeks before the first immunisation takes place. This time frame is necessary for full recovery of the animals and to allow adequate recording of body temperature and/or heart rate, breathing rate and activity during a two to three-week period to establish normal values before immunisations start. Animals will receive one or more immunisations, typically at 4 to 8-week time intervals. Occasionally a longer time frame is needed between immunisations when different vaccine modalities are used for priming and boosting of the immune response. Usually 3 immunisations suffice over a period of 24 weeks. However, in rare occasions these limits may have to be exceeded. Specific rationale will then be presented to the animal welfare body (AWB). Immunisations can be done by several routes (e.g. intradermal injection, intramuscularly, subcutaneously, intravenously, intranasally, intra-tracheally, intra-bronchially using a bronchoscope, or via aerosol using a nebulizer). The route of immunisation depends on the vaccine under investigation. All vaccines have to be sterile and have to be given under aseptic conditions. At regular time intervals, usually two and four weeks after every immunisation, blood is drawn to measure systemic adverse effects, which includes measurement of clinical chemistry and haematology, and to measure induction of cellular and humoral immune responses. The two-week interval after immunisation is chosen, because this is optimal for measuring cellular immune responses, while four weeks is optimal for measuring humoral immune responses. For new vaccine candidates aiming at the induction of mucosal responses, nasal washes and bronchoalveolar lavages (BAL) will be collected before and at time points (usually 2 and 4 weeks) after immunisation to determine the magnitude of local immune responses. Immune responses recorded after the final immunisation will be used to decide whether protection against viral challenge can be reasonably expected. If these responses are too low to realistically expect protection the study will be stopped and animals may be re-used in other non-RSV related experiments. Otherwise, experimental challenge will usually take place between 4 and 8 weeks after the last immunisation, but this may be longer when the longevity of protective responses is being evaluated. This time period is also required to allow immunological memory to form after the last immunisation. RSV infection may be done by intra-nasal, intra-tracheal or intra-broncheal inoculation alone or in combination with oral, intranasal and intraocular inoculation or via aerosol using a nebulizer (as described in appendix 2). The established infection routes for RSV infection using the macaque-adapted virus are intra-nasal and intra-tracheal using a challenge dose ranging between  $10^5$  and  $10^6$  TCID<sub>50</sub>, at which all animals became infected (1, 3). Different vaccine concepts or research questions may, however, may require other challenge viruses or infection routes that need to be established before vaccine evaluation can be performed (described in appendix 2). Clinical symptoms will be monitored twice daily during the infection phase. Nasal and tracheal swabs will be taken before infection, frequently during the first days after infection (daily and then every other day) and subsequently less frequently until day 21, to measure virus replication in the upper airways. Bronchoalveolar lavages (BAL) may be taken at selected time points (max 4 times post infection) to measure virus replication in the lungs, as previously described (1, 3, 4). Blood is collected simultaneously with the swabs, to monitor changes in clinical chemistry and haematology parameters, leucocyte subsets and cytokine production. At the same time points body weight and physiological parameters (e.g. pulse rate, respiratory rate, blood pressure) are recorded and imaging (CT or PET-CT) is performed to measure lung infiltration. After the virus is cleared (usually 21 days post infection) animals are either returned to the experimental stock or they are euthanised and a full necropsy is performed in order to establish whether persistent lung pathology occurred (1). Euthanasia is only performed when assessment of lung pathology is required to establish vaccine safety. In case an animal should reach the humane endpoint during the study it will be immediately euthanised and a full necropsy will be performed to establish cause of death and investigate lung pathology and virus presence in the respiratory tract. In case animals will not be euthanised, the recording devices are surgically removed and body temperature, heart rate, respiratory rate and activity data are analysed, upon which, the animals may be re-used (within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven). The details of each study, regarding the interval between the immunisations, the number and time points of sampling, the specific criteria to proceed with a viral challenge, the time interval between the last immunisation and viral challenge will depend on the actual type of vaccine that is being tested and this will be submitted to the AWB.

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 will be based on statistical power analysis. Calculations take into account the number of animals needed to measure statistically significant induction of immune responses in relation to (unvaccinated) controls. In addition, calculations are performed to establish the number of animals needed to obtain a significant reduction in respiratory tract virus load between the vaccine groups and the challenge control group. Experience in RSV vaccine evaluation studies indicate that statistically significant reductions in virus replication can be obtained with five animals per group (3). In the event different vaccines are compared or a vaccine is compared to previously RSV infected animals, group sizes may be larger. Only the minimum number of animals needed will be used.

### B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Rhesus or cynomolgus macaque	Purpose bred	adult	90	M / F	Not applicable	Not applicable

Provide justifications for these choices

Species	Macaque species have been used in several RSV vaccine studies (1-3). The most frequently used species are the rhesus monkey ( <i>Macaca mulatta</i> ) and cynomolgus macaque ( <i>Macaca fascicularis</i> ). Both species are semi-permissive to RSV infection. It was shown that both rhesus and cynomolgus macaques (infant, young and adult) are equally susceptible to (macaque-adapted) RSV infection (1, 3, 5). Therefore, both rhesus and cynomolgus macaques can be used for RSV vaccine evaluation studies.
Origin	All animals are purpose bred. They are either bred at our institute or obtained from a certified supplier.
Life stages	Adult animals will be used because infant, young and adult animals are equally susceptible to (macaque-adapted) RSV infection (1, 3, 5)
Number	90
Gender	Adult male and female animals can be used. Since there are immunological differences between males and females (6, 7), we prefer that for each individual experiment either all animals are male or all are female, in order to minimise the variation within the experimental test group, thereby increasing the probability of finding statistically significant differences between the experimental groups. This choice is also important with regard to the amount of blood needed to perform all assays. Male animals are usually larger than female animals and therefore more blood per time point can be drawn from males. In case assays need to be performed which consume large amounts of blood, male monkeys are preferred over females.
Genetic alterations	Not applicable
Strain	Not applicable

### C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No



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.

After placement of the recording device in the abdomen and after removal, which is needed in case the animal will not be euthanised after completion of the experiment, animals will receive analgesics for as long as necessary, typically 3 days. In previous studies we have observed that animals can experience some body temperature elevation during the first days after insertion of the recording device, but have recovered very well within 1 week after the operation. Pain relieve will also be applied when substantial induration is seen at the site of vaccine injection. In case of the latter, analgesics known not to interfere with the induction of the vaccine response will be used.

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

1. Discomfort because of insertion or removal of the temperature recording device
2. Discomfort due to injection
3. Discomfort due to lung lavages
4. Discomfort due to virus installation
5. Stress because of sedation and recovery
6. Reduced food intake during the first days after infection
7. Disease symptoms due to the infection

Explain why these effects may emerge.

1. The surgery needed for insertion and removal of the temperature recording device will cause pain and some local inflammation.
2. When vaccines are given by injection, this can cause local pain and irritation.
3. For the lung lavages a bronchoscope is used. Insertion will cause irritation.
4. When virus is given intra-bronchially a bronchoscope is used and this combined with the inoculum volume will cause irritation. Aerosol application implies that animals have to be sedated and forced to breathe via a nebulizer device and this can give irritation.
5. Animals will be repeatedly sedated for vaccine delivery, blood sampling, virus infection, collection of swabs and lung lavages. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
6. Especially during daily sedation during the first 2 days after infection food intake might be reduced.
7. RSV infection can cause fever, coughing, sneezing, nose discharge, laboured breathing, increased breathing rate, loss of appetite, inactivity.

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

1. Surgery will be done under anaesthesia and after surgery analgesics will be applied.
2. Animals will be sedated for vaccine delivery. Only rarely are strong adverse effects seen. Should granuloma formation be observed, then the animal will be sedated, the wound will be cleaned and analgesics are applied if necessary following veterinary consultation.
3. For the lung lavages animals are first deeply sedated and then receive a local muscle relaxant.
4. The same procedure as described under 3 will be followed.
5. Recovery of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.
6. Animals will receive tube feeding. This is applied during sedation.
7. Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached then the animal will be humanely euthanised and a full necropsy will be performed to establish the cause of the disease and viral distribution over the respiratory tract.

#### **E. 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 F

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

Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached that indicates that the maximum duration of severity is reached then the animal will be humanely euthanised. Individual scores are added and the decision is based on the total daily score and veterinarian assessment of discomfort. Symptoms that lead to an immediate endpoint are: open mouth breathing or cyanosis, lethargy as defined by minimal response to human approach.

Indicate the likely incidence.

The percentage of animals reaching the end point will depend on the virus and the challenge dose used. Most RS viruses, including the macaque-adapted human-RSV strain, will only cause minimal disease and typically resolve within 14-21 days (3). In the event another than the macaque-adapted human-RSV strain will be used or when challenge route and / or dose require adaptation, this will first be evaluated in a small number of animals (see appendix 2). Weight will be recorded during the study, but a weight loss of 10% because of the infection has not been observed in any study described thus far and therefore cannot serve as a suitable end point.

#### **F. Classification of severity of procedures**

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

The total amount of discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the surgical implantation and removal of the recording device and development of disease due to infection.

#### **G. 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	<p>The immune system is very complex and the in vivo interactions between virus and/or vaccine and host are not completely understood. At present there is no in vitro model available that can mimic the human immune system sufficiently to study the potential of a vaccine to induce protective immune responses. Due to the complex interaction of RSV with different tissues and the role of local immunity in eradication of the virus, the efficacy of an RSV vaccine to protect against infection can only be adequately established in an animal model.</p> <p>Several animal species have been used as a model for RSV infection (8). However, mice are only susceptible to high RSV challenge doses. Cotton rats and ferrets are also semi-permissive to RSV and recapitulate the natural course of infection. However, these models have the disadvantage that limited immunological tools are available, especially to study innate and cellular adaptive immune responses, which are especially important in the evaluation of vaccine strategies (9). NHP have an immune system that most closely resembles that of humans. Also the availability of many cross reactive reagents makes it possible to study in detail the contribution of the innate immune system and to analyse vaccine induced (local) immune responses and evaluate their role in control of infection. In addition, vaccine strategies that aim to trigger immune responses through targeting of specific cell surface molecules or innate immune receptors have either limited cross reactivity to other animal species or trigger different cell types or different responses because of differences in receptor expression pattern or cell signalling pathways. These aspects are essential for the evaluation of RSV vaccines. For these type of vaccines new vaccination strategies as well as vaccine modalities are used that aim for the induction of protective cellular immune responses or induction of neutralising antibody responses or non-neutralising antibody responses that become effective through interaction with innate immune cells. Here, the close homology between the immune system in NHP and humans is essential for proper induction and adequate analysis of these responses, allowing a better extrapolation to the human situation. Vaccines that will be tested in NHP have to be in the final stages of preclinical development and require this last validation step in order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species and that they are effective in an animal species that has an immune system closely related to humans.</p>
Reduction	<p>The number of animals needed per experiment will be based on statistical power calculation for achieving statistically significant induction of immune responses and a significant reduction in virus load in the respiratory tract between the vaccine groups and the challenge control group. Only the minimum number of animals needed will be used. Since historical data are available on infection in unvaccinated animals (appendix 2), usually less animals can be used in the challenge control group than in the vaccine groups. Furthermore, we aim to evaluate multiple vaccine candidates in a single experiment, so that a single challenge control group can be used. This has to be weighed against the fact that in order to obtain significant differences in immune response between the vaccine groups, more animals per vaccine group may occasionally be required.</p>
Refinement	<p>The use of recording devices enables the monitoring of body temperature, heart- and breathing-rate every 15 minutes. We have designed a method that allows very precise calculation of fever induction caused by influenza infection (10). With this method we have observed a significant reduction in fever by influenza vaccine candidates (11). Such precise measurements are not possible with the traditional rectal temperature measurement. In addition, measurement of breathing rate may provide additional information on the RSV infection severity. Placement and removal of the temperature responders will require a small surgical procedure, which will be done under anaesthesia. Subsequently, animals will receive analgesics as long as required. Animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation.</p>

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

#### H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous RSV vaccine or RSV virus infection studies or that have pre-existing antibodies against RSV are not suitable. In view of the long life-span of the animals of this species re-use of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.

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.

#### I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable

#### J. 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 K.

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.

### End of experiment

#### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

In most studies the animals will be re-used after the virus is cleared (usually at day 21 after infection). However, in cases where possible adverse effects of the vaccine have to be studied animals are humanely euthanised and a full necropsy is performed.

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.



<input checked="" type="checkbox"/> Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?
<input checked="" type="checkbox"/> No > Describe the method of killing.
Euthanasia is done by injection of an anaesthetic dose of ketamine followed by an overdose of barbiturate intravenously
<input type="checkbox"/> Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.
If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.
Not applicable

### References

1. De Swart RL, Kuiken T, Timmerman HH, van Amerongen G, Van Den Hoogen BG, Vos HW, et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) induces interleukin-13-associated hypersensitivity to subsequent RSV infection. *J Virol.* 2002;76(22):11561-9.
2. de Waal L, Wyatt LS, Yuksel S, van Amerongen G, Moss B, Niesters HG, et al. Vaccination of infant macaques with a recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the respiratory syncytial virus F and G genes does not predispose for immunopathology. *Vaccine.* 2004;22(8):923-6.
3. Grunwald T, Tenbusch M, Schulte R, Raue K, Wolf H, Hannaman D, et al. Novel vaccine regimen elicits strong airway immune responses and control of respiratory syncytial virus in nonhuman primates. *J Virol.* 2014;88:3997-4007.
4. Schultheiss T, Stolte-Leeb N, Sopper S, Stahl-Hennig C. Flow cytometric characterization of the lymphocyte composition in a variety of mucosal tissues in healthy rhesus macaques. *J Med Primatol.* 2011;40(1):41-51.
5. Grandin C, Lucas-Hourani M, Clavel M, Taborik F, Vabret A, Tangy F, et al. Evidence for an intranasal immune response to human respiratory syncytial virus infection in cynomolgus macaques. *J Gen Virol.* 2015;96:782-92.
6. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2016;16:626-38.
7. Klein SL, Marriott I, Fish EN. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015;109(1):9-15.
8. Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine.* 2017;35:469-80.
9. Albrecht RA, Liu WC, Sant AJ, Tompkins SM, Pekosz A, Meliopoulos V, et al. Moving Forward: Recent Developments for the Ferret Biomedical Research Model. *mBio.* 2018;9(4).
10. Mooij P, Koopman G, Mortier D, van Heteren M, Oostermeijer H, Fagrouch Z, et al. Pandemic Swine-Origin H1N1 Influenza Virus Replicates to Higher Levels and Induces More Fever and Acute Inflammatory Cytokines in Cynomolgus versus Rhesus Monkeys and Can Replicate in Common Marmosets. *PLoS One.* 2015;10:e0126132.
11. Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, Wagner MV, Zhu X, Hoffman RM, et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science.* 2015;349:1301-6.



## Appendix Description animal procedures

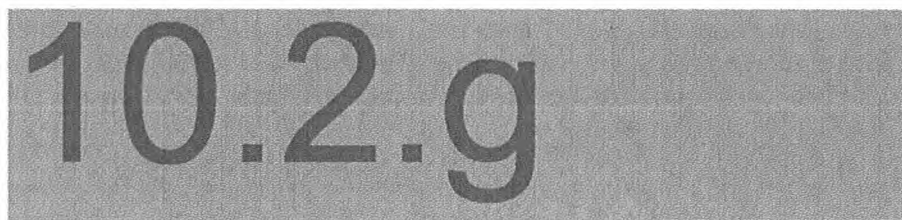
- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for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

### 1 General information

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

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 List the serial number and type of animal procedure



Serial number	Type of animal procedure
2	Establishment of a new RSV infection model in macaques

*Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.*

### 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.

In order to establish the protective efficacy of an RSV vaccine, a well-defined RSV infection model is required. We will use a well-established RSV macaque infection model using a macaque-adapted human RSV virus (1, 2). When a different new challenge virus is used, or the administration route is changed, it is necessary to establish the infectivity and potential pathogenicity of these changes in macaques before the model can be applied in RSV vaccine efficacy studies. To evaluate a new virus or alternative infection route, the virus is inoculated using a standard dose ( $10^5 - 10^7$  TCID<sub>50</sub>). Proper application for vaccine evaluation requires that more than 80% of the animals become infected and that the amount of virus produced in the respiratory tract over the infection period is clearly measurable and that the variation between the animals is sufficiently low to allow measurement of reduction in virus load in vaccinated animals with less than 10 animals per group. In case these parameters are not achieved, the experiment will be repeated with a 10-100 times higher dose. In case any of the animals reaches the clinical endpoint within the first four days after infection, a 10-100 times lower virus dose will be evaluated. Infant, young and adult macaques are all equally sensitive to RSV infection and mount local and systemic immune responses that protects from re-infection (3).

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

A recording device is surgically placed in the abdominal cavity at least 4 weeks before the infection. This time frame is necessary for full recovery of the animals and to allow adequate recording of body temperature, respiratory rate and activity during a two to three week period to establish baseline values before infection. For the established RSV infection model with the macaque-adapted virus two infection routes have been used, namely intra-nasal (2) and intra-tracheal (just below the larynx) (1) using a dose of 105 – 106 TCID50. Using the aforementioned routes and doses all (control) animals became infected (1, 2). In the event a new challenge virus is required for vaccine evaluation, this model needs to be validated: i.e. route of infection and challenge dose need to be established. Clinical symptoms will be monitored twice daily. Nasal and tracheal swabs will be taken before infection, frequently during the first days after infection (daily and then every other day) and subsequently less frequently until day 21, to measure virus multiplication in the upper airways. Small volume (3 mL) bronchoalveolar lavages (BAL) may be taken at selected time points (max 6 times) to determine virus replication in the lungs. Blood is collected simultaneously with the swabs, to monitor changes in clinical chemistry and haematology parameters and leucocyte subsets. At the same time points body weight and physiological parameters are recorded and imaging (CT or PET-CT) is performed to measure lung infiltration. After the virus is cleared (usually at day 21 after infection) animals are either returned to the experimental stock or they are euthanised and a full necropsy is performed in order to investigate lung pathology and virus replication in the different parts of the respiratory tract. However, when animals are not yet virus negative at day 21 an additional tracheal swab or BAL will be taken at day 28. When that is also virus positive, which is very unlikely, the animals will be euthanised in order to preclude further discomfort. In case an animal should reach the humane endpoint during the study it will be immediately euthanised and a full necropsy will be performed to establish lung pathology and virus replication in the respiratory tract. In case animals are returned to the experimental stock the recording devices are surgically removed and body temperature and/or respiratory rate and activity data are analysed. The details of each study, regarding the route of infection, dose used, species and whether animals are to be euthanised at the end of the study will be submitted for approval to the AWB.

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

Experience in the RSV macaque infection model has shown that with a number of four animals an adequate assessment can be made on the reproducibility of infection (2) (all 4 animals need to show virus replication in the respiratory tract). The variability of outcome parameters like: virus production and physiological parameters (fever induction, breathing frequency) needs to be limited. On the basis of these data a power calculation can be made concerning the number of animals needed in a vaccine evaluation study. Should the result of these calculations be that more than 10 animals are needed per group or should not all four animals have become infected, a new experiment with 4 animals is needed with a higher virus dose.

## B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Rhesus or cynomolgus macaque	Purpose bred	adult	40	M / F	Not applicable	Not applicable

Provide justifications for these choices

Species	Macaque species have been used in several RSV vaccine studies (1-3). The most frequently used species are the rhesus monkey ( <i>Macaca mulatta</i> ) and cynomolgus macaque ( <i>Macaca fascicularis</i> ). Both species are semi-permissive to RSV infection. It was shown that both rhesus and cynomolgus macaques (infant, young and adult) are equally susceptible to (macaque-adapted) RSV infection (1-3). Therefore, both rhesus and cynomolgus macaques can be used for RSV vaccine evaluation studies.
Origin	All animals are purpose bred. They are either bred at our institute or obtained from a certified supplier.
Life stages	Adult animals will be used because infant, young and adult animals are equally susceptible to (macaque-adapted) RSV infection (1-3)

Number	40
Gender	Adult male and female animals can be used. Since there are immunological differences between males and females (4, 5), we prefer that for each individual experiment either all animals are male or all are female, in order to minimise the variation within the experimental test group, thereby increasing the probability of finding statistically significant differences between the experimental groups. This choice is also important with regard to the amount of blood needed to perform all assays. Male animals are usually larger than female animals and therefore more blood per time point can be drawn from males. In case assays need to be performed which consume large amounts of blood, male monkeys are preferred over females.
Genetic alterations	Not applicable
Strain	Not applicable

### C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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.

After placement of the recording device in the abdomen and after removal, which is needed in case the animal will not be euthanised after completion of the experiment, animals will receive analgesics for as long as necessary, typically 3 days. In previous studies we have observed that animals can experience some body temperature elevation during the first days after insertion of the recording device, but have recovered very well within 1 week after the operation. Pain relieve will also be applied when substantial induration is seen at the site of vaccine injection. In case of the latter, analgesics known not to interfere with the induction of the vaccine response will be used.

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

1. Discomfort because of insertion or removal of the temperature recording device
2. Discomfort due to lung lavages
3. Discomfort due to virus installation
4. Stress because of sedation and recovery
5. Reduced food intake during the first days after infection
6. Disease symptoms due to the infection

Explain why these effects may emerge.



1. The surgery needed for insertion and removal of the temperature recording device will cause pain and some local inflammation.
2. For the lung lavages a bronchoscope is used. Insertion will cause irritation.
3. When virus is given intra-bronchially a bronchoscope is used and this combined with the inoculum volume will cause irritation. Aerosol application implies that animals have to be sedated and forced to breathe via a nebulizer device and this can give irritation.
4. Animals will be repeatedly sedated for vaccine delivery, blood sampling, virus infection, collection of swabs, imaging and lung lavages. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
5. Especially during daily sedation during the first 2 days after infection food intake will be reduced.
6. RSV infection can cause fever, coughing, sneezing, nose discharge, laboured breathing, loss of appetite, inactivity.

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

1. Surgery will be done under anaesthesia and after surgery analgesics will be applied.
2. For the lung lavages animals are first deeply sedated and then receive a local muscle relaxant.
3. The same procedure as described under 2 will be followed.
4. Recovery of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.
5. Animals will receive tube feeding. This is applied during sedation.
6. Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached then the animal will be euthanised and a full necropsy will be performed to establish the cause of the disease and viral distribution over the respiratory tract.

#### **E. 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 F

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

Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached that indicates that the maximum duration of severity is reached then the animal will be humanely euthanised. Individual scores are added and the decision is based on the total daily score and veterinarian assessment of discomfort. Symptoms that lead to an immediate endpoint are: open mouth breathing or cyanosis, lethargy as defined by minimal response to human approach.

Indicate the likely incidence.

The percentage of animals reaching the end point will depend on the virus and the challenge dose used. Most RS viruses, including the macaque-adapted human-RSV strain, will only cause minimal disease and typically resolve within 14-21 days (1-3, 6-9). In the event another than the macaque-adapted human-RSV strain will be used or when challenge route and / or dose require adaptation, this will first be evaluated in a small number of animals. Weight will be recorded during the study, but a weight loss of 10% because of the infection has not been observed in any study described thus far and therefore cannot serve as a suitable end point.

#### **F. Classification of severity of procedures**

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

The total amount of discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the surgical implantation and removal of the recording device and development of disease due to infection.

#### **G. 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	<p>The immune system is very complex and the in vivo interactions between virus and/or vaccine and host are not completely understood. At present there is no in vitro model available that can mimic the human immune system sufficiently to study the potential of a vaccine to induce protective immune responses. Due to the complex interaction of RSV with different tissues and the role of local immunity in eradication of the virus, the efficacy of an RSV vaccine to protect against infection can only be adequately established in an animal model.</p> <p>Several animal species have been used as a model for RSV infection (10). However, mice are only susceptible to high RSV challenge doses. Cotton rats and ferrets are also semi-permissive to RSV and recapitulate the natural course of infection. However, these models have the disadvantage that limited immunological tools are available, especially to study innate and cellular adaptive immune responses, which are especially important in the evaluation of vaccine strategies (11). NHP have an immune system that most closely resembles that of humans. Also the availability of many cross reactive reagents makes it possible to study in detail the contribution of the innate immune system and to analyse vaccine induced (local) immune responses and evaluate their role in control of infection. In addition, vaccine strategies that aim to trigger immune responses through targeting of specific cell surface molecules or innate immune receptors have either limited cross reactivity to other animal species or trigger different cell types or different responses because of differences in receptor expression pattern or cell signalling pathways. These aspects are essential for the evaluation of RSV vaccines. For these type of vaccines new vaccination strategies as well as vaccine modalities are used that aim for the induction of protective cellular immune responses or induction of neutralising antibody responses or non-neutralising antibody responses that become effective through interaction with innate immune cells. Here, the close homology between the immune system in NHP and humans is essential for proper induction and adequate analysis of these responses, allowing a better extrapolation to the human situation. Vaccines that will be tested in NHP have to be in the final stages of preclinical development and require this last validation step in order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species and that they are effective in an animal species that has an immune system closely related to humans.</p>
Reduction	<p>Experience from previous experiments has shown that when the virus is inoculated by a standard route at a standard dose, four animals per test group are sufficient in order to determine whether a suitable infection model has been achieved and to perform a power calculation to determine the number of animals needed in a vaccine evaluation study. In case the criteria, as outlined under A are not met, a second experiment may be needed with an adapted dose. On the basis of the outcome of the first study the number of animals required in follow-up experiments can be calculated and less animals may be needed. Only the minimum number of animals needed, will be used.</p>
Refinement	<p>The use of recording devices makes it possible to record physiological parameters, (temperature, heart- and respiratory-rate etc.) every 15 minutes. For influenza infection, we have designed a method that allows very precise calculation of fever induction caused by the infection (12). With this method we observed a significant fever reductions in influenza vaccinated animals (13). Such precise measurements are not possible with the traditional methods. RSV infection may, unlike influenza, not cause fever, but an increase in respiratory rate. As currently very limited information is available on these parameters in the macaque RSV infection model, we will evaluate their suitability as exploratory outcome measures. Placement and removal of the recording devices will require a small surgery, which will be done under anaesthesia. Subsequently animals will receive analgesics as long as required. Animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation.</p>

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

#### H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous RSV vaccine or RSV virus infection studies or that have pre-existing antibodies against RSV are not suitable. In view of the long life-span of the animals of this species re-use of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.

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.

#### I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

[Not applicable]

#### J. 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 K.

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.

### End of experiment

#### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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


In most studies the animals will be re-used after the virus is cleared (usually at day 21 after infection). However, in cases where possible adverse effects of the vaccine have to be studied animals are humanely euthanised and a full necropsy is performed.

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.

<input checked="" type="checkbox"/> Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?
<input checked="" type="checkbox"/> No > Describe the method of killing.
Euthanasia is done by injection of an anaesthetic dose of ketamine followed by an overdose of barbiturate intravenously
<input type="checkbox"/> Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.
If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.
Not applicable

## References

1. De Swart RL, Kuiken T, Timmerman HH, van Amerongen G, Van Den Hoogen BG, Vos HW, et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) induces interleukin-13-associated hypersensitivity to subsequent RSV infection. *J Virol.* 2002;76(22):11561-9.
2. Grunwald T, Tenbusch M, Schulte R, Raue K, Wolf H, Hannaman D, et al. Novel vaccine regimen elicits strong airway immune responses and control of respiratory syncytial virus in nonhuman primates. *J Virol.* 2014;88:3997-4007.
3. Grandin C, Lucas-Hourani M, Clavel M, Taborik F, Vabret A, Tangy F, et al. Evidence for an intranasal immune response to human respiratory syncytial virus infection in cynomolgus macaques. *J Gen Virol.* 2015;96:782-92.
4. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2016;16:626-38.
5. Klein SL, Marriott I, Fish EN. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015;109(1):9-15.
6. de Waal L, Wyatt LS, Yuksel S, van Amerongen G, Moss B, Niesters HG, et al. Vaccination of infant macaques with a recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the respiratory syncytial virus F and G genes does not predispose for immunopathology. *Vaccine.* 2004;22(8):923-6.
7. Schmidt AC, McAuliffe JM, Murphy BR, Collins PL. Recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (B/HPIV3) expressing the respiratory syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and HPIV3. *J Virol.* 2001;75:4594-603.
8. McArthur-Vaughan K, Gershwin LJ. A rhesus monkey model of respiratory syncytial virus infection. *J Med Primatol.* 2002;31(2):61-73.
9. Vaughan K, Rhodes GH, Gershwin LJ. DNA immunization against respiratory syncytial virus (RSV) in infant rhesus monkeys. *Vaccine.* 2005;23(22):2928-42.
10. Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine.* 2017;35:469-80.
11. Albrecht RA, Liu WC, Sant AJ, Tompkins SM, Pekosz A, Meliopoulos V, et al. Moving Forward: Recent Developments for the Ferret Biomedical Research Model. *mBio.* 2018;9(4).
12. 10.2.e  

13. Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, Wagner MV, Zhu X, Hoffman RM, et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science.* 2015;349:1301-6.





> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.e en 10.2.g

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD 10.2.g 202114508  
**Bijlagen**  
2

**Datum** 18 februari 2021

**Betreft** Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Geachte** 10.2.e

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 februari 2021. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD 10.2.g 202114508. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

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

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

#### **Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

**Datum:**

18 februari 2021

**Aanvraagnummer:**

AVD10.2.g 202114508

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

**Bijlagen:**

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



**Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:

10.2.g

Naam instelling of organisatie:

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

10.2.e

**Gegevens verantwoordelijke onderzoeker**

Naam:

10.2.e

Functie:

10.2.e

Afdeling:

Virologie

Telefoonnummer:

10.2.e en 10.2.g

E-mailadres:

**Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker**

Naam:

10.2.e

Functie:

10.2.e

Afdeling:

Virologie

Telefoonnummer:

10.2.e en 10.2.g

E-mailadres:

**Gegevens gemachtigde**

Naam:

10.2.e

Adres:

10.2.g

Postbus:

Postcode en plaats:

Wilt u een nieuwe machtiging  
afgeven?

Wat mag de gemachtigde  
doen?

Een projectvergunning aanvragen

Een wijziging op een verleende  
projectvergunning aanvragen

Een melding doorgeven op een verleende  
projectvergunning

Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren  
met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere  
handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede  
afwikkeling van het bezwaarschrift

Alle bovenstaande opties

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag  
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum:

1 augustus 2021

Geplande einddatum:

1 augustus 2026

Titel project:

Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques

Naam DEC:

Postadres DEC:

E-mailadres DEC:

10.2.g

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1.673,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging

**Ondertekening**

Naam:

Functie:

Plaats:

Datum:

10.2.e

10.2.g

9 februari 2021





Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g  
10.2.e  
10.2.g

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD10.2.g202114508  
**Bijlagen**  
2

Datum 18 februari 2021  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 18 februari 2021  
Vervaldatum: 20 maart 2021  
Factuurnummer: 2114508

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10.2.g202114508	€ 1.673,00

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 te 's Gravenhage.

# Format DEC-advies

6

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

## A. Algemene gegevens over de procedure

Aanvraagnummer: AVD10.2.g202114508

1. Titel van het project: Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques
2. Titel van de NTS: Onderzoek naar de beschermende werking van vaccins tegen Respiratoir Syncytieel Virus in apen
3. Type aanvraag:
  - X nieuwe aanvraag projectvergunning
4. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: 10.2.g
  - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e
  - mailadres contactpersoon: 10.2.g
5. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 03-02-2021 (18-02-2021: Verzoek om advies van CCD)
  - aanvraag compleet: 15-03-2021
  - in vergadering besproken: 11-02-2021, 11-03-2021,
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van/tot 13-02-2021 tot 23-02-2021 en van 11-3-2021-15-03-2021
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen nvt
  - aanpassing aanvraag 23-02-2021, 15-03-2021
  - advies aan CCD: 15-03-2021

6. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD. De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend.

*Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.*

7. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 13-02-2021
- De gestelde vragen betroffen de volgende onderwerpen:
  - Fasering van de studie
  - Experimentele ontwerp van de studie
  - Het maximale aantal handelingen dat de dieren zal ondergaan
  - Onderbouwing aantal dieren
  - Keuze diersoort
  - Primaire uitkomst parameter(s) en onderbouwing aantal dieren per groep
  - Onderbouwing aantallen voor opzetten nieuw challenge model
  - Onderbouwing vaccinatie routes
  - Benoemen alle bronnen van ongerief
  - Humane eindpunten
  - Gebruik dataloggers
  - Tekstuele aanpassingen aan NTS
- Datum antwoord: 3-12-2020
- Verstreckte antwoorden: De verstreckte antwoorden zijn naar tevredenheid beantwoord. Echter niet alles was verwerkt in de aanvraag. De DEC heeft verzocht dit alsnog te doen en ook de titel van de NTS in het Nederlands aan te leveren (datum vraag: 11-3-2021).
- Datum antwoord: 15-03-2021
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC). N.v.t.

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

1. Het project is vergunning-plichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren: De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen kennis over immunologie en kennis over vaccins tegen virussen, onderzoek met niet-humane primaten, en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op het gebied van ontwerp van proeven, statistiek, de proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, de ethiek en van proefdieren en hun bescherming.
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Een van de leden is betrokken bij dit onderzoek. Dit lid heeft de vergadering verlaten tijdens de bespreking van het project.

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

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.  
Dit project betreft een preklinisch onderzoek naar de veiligheid, immunogeniciteit en effectiviteit van vaccins die ontwikkeld worden voor Human Respiratory Syncytial virus (RSV) in makaken. In de aanvraag is terecht een aantal voorwaarden vastgesteld waaraan kandidaat vaccins moeten voldoen alvorens tot verdere evaluatie in makaken kan worden overgegaan.  
Indien gebruik gemaakt moet worden van een nieuwe virus variant voor de besmetting, zullen eerst experimenten worden uitgevoerd om te bepalen wat de juiste besmettingsdosis en route is voor die variant. Immunisaties met de kandidaat vaccins zullen eerst worden uitgevoerd en geëvalueerd voordat besmetting plaatsvindt. Alleen wanneer de immuniteit voldoende hoog is zal besmetting plaatsvinden. De aanvraag heeft een duidelijk omschreven en concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is het ook duidelijk met welk ongerief individuele dieren zullen worden geconfronteerd. De DEC is ervan overtuigd dat er gedurende de looptijd van het project op zorgvuldige wijze besluiten zullen worden genomen over de voortgang van het onderzoek en dat er niet onnodig dieren zullen worden gebruikt. De



DEC vindt dat het project toetsbaar is en voldoende samenhang heeft om aangemerkt te worden als een project.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).

Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

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

De aangegeven doelcategorieën, te weten ‘translationeel of toegepast onderzoek’ sluiten aan bij het projectvoorstel. In dit projectvoorstel zal worden onderzocht of kandidaat RSV vaccins bescherming bieden tegen (de gevolgen van) een RSV infectie. Wanneer een vaccin voldoende bescherming biedt kan dit vervolgens in een klinische studie getest worden en uiteindelijk zal het vaccin worden toegepast in drie doelgroepen: jonge kinderen, mensen met onderliggende aandoeningen en oudere mensen.

#### *Belangen en waarden*

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

Het directe doel van dit project is de evaluatie van RSV vaccins op veiligheid, immunogeniciteit en beschermende werking in resus of Java apen. Het uiteindelijke doel is een werkzaam vaccin op de markt te brengen dat kan worden toegepast in de relevante doelgroepen.

Er is binnen dit onderzoek een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*). De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de maatschappij en met name jonge kinderen, mensen met onderliggende ziekte en ouderen, de aanvragende onderzoeksinstituten, de bedrijven die RSV vaccins

ontwikkelen en de wetenschap.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. Er is sprake van instrumenteel gebruik, de dieren zullen door de huisvesting in een onderzoeksfaciliteit beperkt worden in hun natuurlijke gedrag. De dieren zullen stress ondervinden door biotechnische handelingen en mogelijk enige mate van pijn na het plaatsen van een datalogger. Daarnaast kunnen dieren ziekteverschijnselen ontwikkelen ten gevolge van de virusinfectie, met name koorts, hoesten, niezen, ademhalingsproblemen, benauwdheid, verlies aan eetlust.

Voor de potentiële patiënten en de maatschappij is dit onderzoek van groot belang, omdat een werkzaam vaccin uiteindelijk kan bijdragen aan het voorkomen van ziekte en sterfte na besmetting met RSV. Voor de bedrijven die vaccins ontwikkelen geldt dat het op de markt brengen van een werkzaam vaccin van economisch belang is.

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie over de werkzaamheid van nieuwe types van vaccins die door hun ontwerp alleen goed in een niet-humane primaten diersoort geëvalueerd kunnen worden. Het is evident dat dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken? Er zijn geen substantiële milieueffecten te verwachten binnen de kaders of ten gevolge van dit project. De risico's worden beheerst door goede inperking.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

De kennis en kunde binnen de instelling en de directe betrokkenen bij de dierproeven met primaten zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de jarenlange ervaring van de instelling met het testen van vaccins in makaken.

De DEC concludeert dat de aanvragers voor de uitvoering van de voorgestelde experimenten beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van de voorgestelde dierproeven.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet sluit hier logisch op aan. Eerst zullen de kandidaat vaccins getest worden op veiligheid en immunogeniciteit.

Alleen als een vaccine geen onverwachte negatieve bijwerkingen heeft en voldoende immunogeen blijkt te zijn, zullen de gevaccineerde dieren besmet worden met RSV. De commissie is ervan overtuigd dat met de voorgestelde aanpak de doelen gehaald kunnen worden.

#### *Welzijn dieren*

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

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

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de noodzaak niet-human primaten te gebruiken voor de evaluatie voor RSV vaccins. Het hierbij om nieuwe type vaccins waarvan nog niet eerder is aangetoond dat deze werkzaam kunnen zijn in primaten. Ook zal dit vaccins betreffen die alleen in apen getest kunnen worden omdat componenten van het vaccins zeer soort-specifiek zijn en niet kunnen worden geëvalueerd in andere proefdiersoorten. De DEC het eens met het gebruik van apen voor dit onderzoek om deze redenen.

Hergebruik zal plaatsvinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven. De DEC is het eens met hergebruik van de dieren om deze redenen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III van de richtlijn.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.
- Het ongerief voor de dieren is correct als matig ingeschat. Het ongerief zal vooral veroorzaakt worden door het frequent bloed afnemen bij de dieren, het plaatsen van een datalogger, het uitvoeren van CT scans en het besmetten met RSV met de daarop volgende klinische symptomen.
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit.
- De integriteit van de dieren wordt aangetast door het instrumentele gebruik. De experimentele procedures geven geen blijvende lichamelijke veranderingen.
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.
- Het bereiken van een humaan eindpunt is goed gedefinieerd en toegespitst op de aard van de handelingen. Dieren zullen niet onnodig lijden omdat de dieren direct uit de proef genomen zullen worden en adequaat behandeld zullen worden mochten er complicaties optreden. Het instituut heeft veel ervaring op het gebied van het testen van vaccin voor luchtweg virussen en de commissie acht het waarschijnlijk dat bij geen van de dieren het humane eindpunt bereikt zal worden.
14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn.
- De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De immunrespons op een vaccin in een zoogdier is te complex om die in vitro of in silico te modelleren. Het is essentieel dat een vaccin zal worden getest op effectiviteit en veiligheid in een hiervoor relevante diersoort (zie ook C9).
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.
- Er zullen in de loop van het project maximaal 3 vaccin kandidaten worden getest op veiligheid, immunogeniciteit en bescherming tegen infectie. Daarvoor is ingeschat dat er per vaccintest maximaal 30 dieren zullen worden ingezet. De precieze groepsgroottes zijn op dit moment nog niet bekend en worden ingeschat op 10 dieren per groep. Op basis van power analyses zullen de uiteindelijke



groepsgroottes worden bepaald waarmee statistisch significante en relevante resultaten kunnen worden behaald. Deze marges en het daarmee het maximaal aantal te gebruiken dieren is op basis van de resultaten uit het voorafgaande onderzoek ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de aangevraagde looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog wetenschappelijk betrouwbare en verantwoorde resultaten kunnen worden verkregen (power berekeningen). Vanwege de op dit moment inherente onzekerheid over de variatie in de uitleesparameters is er door de indieners voor wat betreft het aantal dieren uitgegaan van een maximum scenario. Maximaal 2 nieuwe virusvarianten zullen worden gebruikt om vast te stellen welke virus dosis gebruikt moet worden voor de besmettingsproeven. Hiervoor zullen 4 dieren per dosisgroep en in totaal maximaal 16 dieren worden gebruikt. De commissie is er vanuit gegaan dat hierbij ook het aantal vaccinkandidaten en aantal experimenten kader stellend zijn.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe.

De uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van goed geadapteerde en sociaal gehuisveste dieren. Er zal sedatie worden toegepast tijdens de onderzoeksprocedures. Dieren worden gedurende de gehele studie gemonitord door ervaren diervverzorgers en een klinische scorelijst wordt bijgehouden. De dieren staan onder veterinaire begeleiding. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

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

N.v.t.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

In onderhavige projectaanvraag worden dieren van één geslacht gebruikt. De immunrespons van mannen en vrouwen is verschillend. Door dieren van hetzelfde geslacht te nemen zal de variatie in de proefuitkomsten zo klein mogelijk zijn en dit zal de variatie in de uitkomst parameters verkleinen.

Daardoor zullen minder proefdieren nodig zijn dan wanneer er met groepen van gemengde geslachten wordt gewerkt. Er is geen sprake van overschotten.

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

De dieren zullen niet worden gedood aan het einde van de studie. De DEC is het eens met het eventuele hergebruik van de dieren mits er aan de kaders gesteld in de Wet op de Dierproeven is voldaan.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. De dieren zullen niet worden gedood aan het einde van de experimenten. De dieren kunnen eerder in onderzoek zijn gebruikt en kunnen na afloop voor hergebruik bestemd worden, dit alles met inachtneming van overwegingen rond dierenwelzijn.

*NTS*

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

## **D. Ethische afweging**

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het belang van het testen van vaccinkandidaten voor RSV op veiligheid, immunogeniciteit, en op bescherming in apen, het ongerief dat de dieren daardoor wordt aangedaan en is bij de uitvoering van deze experimenten aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren, andere onderzoek modellen of patiënten?
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn,

ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

Alle 106 dieren (resus of java apen) zullen hoogstens matig ongerief ondergaan. Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Het betreft dieren waarbij de dieren geïmmuniseerd worden met een experimenteel RSV vaccin en vervolgens zullen worden besmet met RS virus. De welzijnsaantasting kan resulteren in ongerief na het plaatsen van een datalogger, het afnemen van bloed of slijmvlies monsters, en de klinische verschijnselen van de RSV infectie. Alle handelingen zullen onder sedatie of volledige narcose gebeuren. Het ongerief is dan veelal het bijkomen uit de verdoving/narcose. Ongerief en lijden zal zo veel mogelijk worden beperkt. Daarmee resulteert dit in maximaal matig ongerief voor de dieren. De waarde voor de patiënten en de samenleving is het op termijn beschikbaar komen van een werkzaam vaccin voor RSV. Op dit moment is er geen werkzaam vaccin voor RSV beschikbaar. RSV veroorzaakt met name bij de risicogroepen (heel jonge kinderen, ouderen en mensen met een verzwakt immuunsysteem of onderliggende ziekten) een ernstige lage longinfectie en vaak zelfs mortaliteit. De behandeling van deze patiënten is een zware belasting van de zorg wereldwijd. Bovendien is er voor de patiënten een risico op vervolgverschijnselen (ademhalingsproblemen, hyperreactiviteit van de luchtwegen en astma). Voor de producent van het vaccin is het op de markt brengen van een vaccin van economisch belang. Echter het belang voor de maatschappij overstijgt dit belang vele malen.

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

De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling: het testen van vaccinkandidaten voor RSV op veiligheid, immunogeniciteit, en op bescherming in niet-humane primaten. Het uiteindelijke doel is het op de markt brengen van een werkzaam vaccin voor RSV. Deze doelstelling vertegenwoordigt een essentieel

belang voor de maatschappij omdat RSV in risico groepen een ernstige luchtweginfectie kan veroorzaken met de dood als gevolg. Alleen een werkzaam en veilig vaccin kan dit voorkomen. De DEC is van mening dat het gebruik van niet-humane primaten voor dit onderzoek gerechtvaardigd is. Het gaat in dit onderzoek om nieuwe vaccinatie strategieën die pas klinisch kunnen worden getest als (ook) in niet-humane primaten is aangetoond dat de vaccins beschermen tegen een RSV infectie.

De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het onderzoek en de uitvoering hiervan. 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 voorkomen wordt dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten zullen ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is samenvattend van mening dat aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent de 3 V's en de kwaliteit van het onderzoek is voldaan en dat het hierboven genoemde belang voor de samenleving als geheel het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van welzijn en integriteit) rechtvaardigt.

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

X Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD. Het betreft hier niet-humane primaten.

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten: geen

### 2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### 3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project.

Er zijn bij de beoordeling van dit project geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.



10.2.e

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** woensdag 24 maart 2021 13:13  
**Aan:** 10.2.e en 10.2.g  
**CC:**  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

Geachte 10.2.e

Op 18-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114508. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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:

#### Niet technische samenvatting

U spreekt bij reasons for the planned fate of the animals dat dieren zullen worden geëuthanaseerd. De CCD vindt dit verullend taalgebruik. Kunt u euthanaseren veranderen in doden? Bij het tabblad expected harms is het aantal dieren dat u wilt gebruiken voor uw onderzoek verwarrend. Het lijkt nu alsof u 212 apen wilt gebruiken in plaats van 106 apen. Kunt u dit aanpassen zodat helder is dat het hier om 106 dieren gaat? Bij predicted harms is tweemaal dezelfde tekst te lezen. Kunt u de tekst eenmaal weergeven?

#### Onduidelijkheden

U spreekt bij bijlagen 3.4.3.1. en 3.4.3.2. van de dierproeven bij verfijning over het vasten van de dieren. Dit is afwijkend van de richtlijn. Kunt u bij punt C invullen dat de dieren zullen worden gevast, en daarbij onderbouwen waarom dit nodig is?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

#### Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028

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

10.2.e

8

**Van:** 10.2.e en 10.2.g  
**Verzonden:** woensdag 24 maart 2021 16:04  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl; 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD<sup>10.2.g</sup>202114508

**Categorieën:** 10.2.e

Geachte 10.2.e

Dank voor het toezenden van de CCD vragen.

Betreffende het aantal in de NTS:

In de projectaanvraag wordt toestemming gevraagd voor maximaal 106 dieren (resus of cynomolgus makaken). Beide soorten zijn geschikt voor de beschreven experimenten, maar in sommige gevallen (b.v. vergelijk eerdere studies of beschikbaarheid van reagentia) kan echter een specifieke soort nodig zijn. Het is daarom niet mogelijk om a priori de aantallen per soort vast te stellen. In het NTS Excel formulier is er geen mogelijkheid om dit aan te geven, dan wel dit te verduidelijken. Daarom is in eerste instantie 106 dieren bij beide soorten ingevoerd.

Graag uw advies hoe de aantallen per soort duidelijker weer te geven.

Betreffende onduidelijkheden:

Vasten had hier niet genoemd moeten worden, omdat het een regulier onderdeel van de sedatieprocedure is. De tekst in de bijlages is aangepast naar: "During the first 2 days of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, since animals will be sedated daily during the first days after infection and the food intake during this period would otherwise be very limited."

Het is daarom dus ook niet nodig om dit onder punt C te verduidelijken

De aangepaste stukken zullen via NetFTP worden ingediend.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

10.2.e en 10.2.g

**From:** info@zbo-ccd.nl [mailto:info@zbo-ccd.nl]

**Sent:** 24 March 2021 13:13

**To:** 10.2.e en 10.2.g

**Cc:**

**Subject:** Aanhouden AVD<sup>10.2.g</sup>202114508

Op 18-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114508. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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:

### Niet technische samenvatting

U spreekt bij reasons for the planned fate of the animals dat dieren zullen worden geëuthanaseerd. De CCD vindt dit verullend taalgebruik. Kunt u euthanasieren veranderen in doden? Bij het tabblad expected harms is het aantal dieren dat u wilt gebruiken voor uw onderzoek verwarrend. Het lijkt nu alsof u 212 apen wilt gebruiken in plaats van 106 apen. Kunt u dit aanpassen zodat helder is dat het hier om 106 dieren gaat? Bij predicted harms is tweemaal dezelfde tekst te lezen. Kunt u de tekst eenmaal weergeven?

### Onduidelijkheden

U spreekt bij bijlagen 3.4.3.1. en 3.4.3.2. van de dierproeven bij verfijning over het vasten van de dieren. Dit is afwijkend van de richtlijn. Kunt u bij punt C invullen dat de dieren zullen worden gevestigd, en daarbij onderbouwen waarom dit nodig is?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

### Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

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

10.2 g





10.2.e

**Van:** 10.2.e  
**Verzonden:** woensdag 24 maart 2021 16:37  
**Aan:** Info-zbo  
**CC:** 10.2.e  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

NTS: Ja lijkt me de beste optie, en dan kunnen we wel ergens een opmerking neerzetten in de NTS ook voor publicatie (onderaan staan daar speciaal vakjes voor aangemaakt)

11.1

**Van:** 10.2.e en 10.2.g @rvo.nl> Namens Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 24 maart 2021 16:12  
**Aan:** 10.2.e en 10.2.g @rvo.nl>  
**Onderwerp:** FW: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

Hee beste,

Zie onderstaande antwoorden van mijn apenaanvraag. 11.1

en jij het daarmee eens?

11.1

jij?

Wat denk

Groetjes 10.2.e

**Van:** 10.2.e en 10.2.g  
**Verzonden:** woensdag 24 maart 2021 16:04  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl; 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

8

Geachte 10.2.e

Dank voor het toezenden van de CCD vragen.

Betreffende het aantal in de NTS:

In de projectaanvraag wordt toestemming gevraagd voor maximaal 106 dieren (resus of cynomolgus makaken). Beide soorten zijn geschikt voor de beschreven experimenten, maar in sommige gevallen (b.v. vergelijk eerdere studies of beschikbaarheid van reagentia) kan echter een specifieke soort nodig zijn. Het is daarom niet mogelijk om a priori de aantallen per soort vast te stellen. In het NTS Excel formulier is er geen mogelijkheid om dit aan te geven, dan wel dit te verduidelijken. Daarom is in eerste instantie 106 dieren bij beide soorten ingevoerd. Graag uw advies hoe de aantallen per soort duidelijker weer te geven.

Betreffende onduidelijkheden:

Vasten had hier niet genoemd moeten worden, omdat het een regulier onderdeel van de sedatieprocedure is. De tekst in de bijlages is aangepast naar: "During the first 2 days of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, since animals will be sedated daily during the first days after infection and the food intake during this period would otherwise be very limited."

Het is daarom dus ook niet nodig om dit onder punt C te verduidelijken

De aangepaste stukken zullen via NetFTP worden ingediend.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

10.2.e en 10.2.g

From: info@zbo-ccd.nl [mailto:info@zbo-ccd.nl]

Sent: 24 March 2021 13:13

To: 10.2.e en 10.2.g

Cc:

Subject: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

7

Geachte 10.2.e

Op 18-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114508. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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:

#### **Niet technische samenvatting**

U spreekt bij reasons for the planned fate of the animals dat dieren zullen worden geëuthanaseerd. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u euthanaseren veranderen in doden? Bij het tabblad expected harms is het aantal dieren dat u wilt gebruiken voor uw onderzoek verwarrend. Het lijkt nu alsof u 212 apen wilt gebruiken in plaats van 106 apen. Kunt u dit aanpassen zodat helder is dat het hier om 106 dieren gaat? Bij predicted harms is tweemaal dezelfde tekst te lezen. Kunt u de tekst eenmaal weergeven?

#### **Onduidelijkheden**

U spreekt bij bijlagen 3.4.3.1. en 3.4.3.2. van de dierproeven bij verfijning over het vasten van de dieren. Dit is afwijkend van de richtlijn. Kunt u bij punt C invullen dat de dieren zullen worden gevestigd, en daarbij onderbouwen waarom dit nodig is?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

#### **Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

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

10.2.g

10.2.e

**Van:** 10.2.e namens Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 24 maart 2021 17:09  
**Aan:** 10.2.e  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

Beste 10.2.e

Dank voor u snelle bericht. Wat betreft het vasten, kunt u dit wel onder A deel 2 proposed animal procedures van de bijlagen dierproeven benoemen? Zo wordt er een volledig beeld weergegeven van de handelingen die de dieren ondergaan.

Het nieuwe format is ook bij de CCD wennen. Ik zie het probleem dat bepaalde zaken niet verduidelijkt kunnen worden. Mijn voorstel zou zijn om bij beide soorten als aantal 53 neer te zetten. Dat klopt dan niet met de werkelijkheid, het is immers afhankelijk van beschikbaarheid en vraagstelling welke soort er gebruikt kan gaan worden. Toch zou ik hier de voorkeur aan geven dan wanneer het lijkt alsof er twee keer zoveel dieren zullen worden ingezet voor het onderzoek.

Ik zie de aangepaste documenten graag tegemoet.

Met vriendelijke groet,  
 10.2.e

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

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 7890789  
 E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Van:** 10.2.e  
**Verzonden:** woensdag 24 maart 2021 16:04  
**Aan:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl); 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

8

Geachte 10.2.e

Dank voor het toezenden van de CCD vragen.

Betreffende het aantal in de NTS:

In de projectaanvraag wordt toestemming gevraagd voor maximaal 106 dieren (resus of cynomolgus makaken). Beide soorten zijn geschikt voor de beschreven experimenten, maar in sommige gevallen (b.v. vergelijk eerdere studies of beschikbaarheid van reagentia) kan echter een specifieke soort nodig zijn. Het is daarom niet mogelijk om a priori de aantallen per soort vast te stellen. In het NTS Excel formulier is er geen mogelijkheid om dit aan te geven, dan wel dit te verduidelijken. Daarom is in eerste instantie 106 dieren bij beide soorten ingevoerd. Graag uw advies hoe de aantallen per soort duidelijker weer te geven.

Betreffende onduidelijkheden:

Vasten had hier niet genoemd moeten worden, omdat het een regulier onderdeel van de sedatieprocedure is. De tekst in de bijlages is aangepast naar: "During the first 2 days of the infection the animal will receive tube feeding."



This is necessary, since animals will be sedated daily during the first days after infection and the food intake during this period would otherwise be very limited. "

Het is daarom dus ook niet nodig om dit onder punt C te verduidelijken

De aangepaste stukken zullen via NetFTP worden ingediend.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

10.2.e en 10.2.g

**From:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) [mailto:[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)]

**Sent:** 24 March 2021 13:13

**To:** 10.2.e en 10.2.g

**Cc:**

**Subject:** Aanhouden AVD<sup>10.2.g</sup>202114508

7

Geachte 10.2.e

Op 18-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD<sup>10.2.g</sup>202114508. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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:

#### **Niet technische samenvatting**

U spreekt bij reasons for the planned fate of the animals dat dieren zullen worden geëuthanaseerd. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u euthanaseren veranderen in doden? Bij het tabblad expected harms is het aantal dieren dat u wilt gebruiken voor uw onderzoek verwarrend. Het lijkt nu alsof u 212 apen wilt gebruiken in plaats van 106 apen. Kunt u dit aanpassen zodat helder is dat het hier om 106 dieren gaat? Bij predicted harms is tweemaal dezelfde tekst te lezen. Kunt u de tekst eenmaal weergeven?

#### **Onduidelijkheden**

U spreekt bij bijlagen 3.4.3.1. en 3.4.3.2. van de dierproeven bij verfijning over het vasten van de dieren. Dit is afwijkend van de richtlijn. Kunt u bij punt C invullen dat de dieren zullen worden gevast, en daarbij onderbouwen waarom dit nodig is?

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 dit bericht op. U kunt dit

aanleveren via NetFTP.

**Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0900 280028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

10.2.g

Betreft: vragen CCD over AVD <sup>10.2.g</sup> 202114508

11

Geachte <sup>10.2.e</sup>

Dank voor het toezenden van de CCD vragen.

Betreffende het aantal in de NTS:

In de projectaanvraag wordt toestemming gevraagd voor maximaal 106 dieren (resus of cynomolgus makaken). Beide soorten zijn geschikt voor de beschreven experimenten, maar in sommige gevallen (b.v. vergelijk eerdere studies of beschikbaarheid van reagentia) kan echter een specifieke soort nodig zijn. Het is daarom niet mogelijk om a priori de aantallen per soort vast te stellen. In het NTS Excel formulier is er geen mogelijkheid om dit aan te geven, dan wel dit te verduidelijken. Daarom is in eerste instantie 106 dieren bij beide soorten ingevoerd.

Graag uw advies hoe de aantallen per soort duidelijker weer te geven.

Betreffende onduidelijkheden:

Vasten had hier niet genoemd moeten worden, omdat het een regulier onderdeel van de sedatieprocedure is. De tekst in de bijlages is aangepast naar: "During the first 2 days of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, since animals will be sedated daily during the first days after infection and the food intake during this period would otherwise be very limited." Het is daarom dus ook niet nodig om dit onder punt C te verduidelijken

Met vriendelijke groet,

<sup>10.2.e</sup>

10.2.e en 10.2.g



## Formulier

### Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

10.2.g

Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques

#### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project?

*U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*

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

#### 3 Algemene projectbeschrijving

##### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Human respiratory syncytial virus (RSV) is the commonest cause of lower respiratory tract infection (LRTI) in children, worldwide, causing disease in an estimated 34 million children, >3 million hospitalisations, and 66,000–199,000 deaths in children under 5 years, each year (1). The majority of deaths occur in low- and middle-income countries (1, 2). Most children are infected during the first year



of life, and all have been infected by their second year. Although there is limited viral antigenic variation, the duration of immunity induced by RSV is short-lived and recurrent infections occur throughout life (3). The peak incidence of severe disease is in infants 2–7 months of age. Moreover, RSV infection in infancy is also associated with the subsequent development of chronic respiratory morbidity (e.g., asthma, wheezing) (4). Because RSV immunity is short-lived, repeated infections occur throughout life. Besides children, RSV also contributes to excess mortality in the elderly (5, 6) and in immunosuppressed individuals of any age (7). Few epidemiological data on RSV infections are available in adults, but it is estimated to cause up to 5% of community-acquired pneumonia, mainly in older adults and those with co-morbidities in whom a 9 to 12% case fatality rate is observed (8, 9). The economic impact of RSV disease in adults is estimated to be greater than that of influenza in relation to numbers of days lost from work (10, 11). There is no licensed RSV vaccine and only one effective anti-viral therapy (monoclonal antibody). The availability of an effective RSV vaccine would reduce the impact of RSV infections in the target groups and contribute to public health. An alternative strategy to protect neonates from RSV infection is vaccination of pregnant women. Therefore RSV vaccine candidates are being developed for three main target groups: infants and toddlers (6 mo to 5 yrs), pregnant women and the elderly. The name Respiratory Syncytial Virus is derived from an effect mediated by the viral F protein, causing membrane fusion with virus infected and neighbouring cells forming so-called syncytia. RSV is a negative-sense, single-stranded RNA virus of the family Pneumoviridae. Two antigenic subgroups of RSV are known A and B, with subgroup A being responsible for severe clinical cases and subgroup B with asymptomatic cases. The RSV genome is approximately 15 k base-pairs, with 10 genes encoding a total of 11 proteins (12). Of these proteins the F protein (fusion), expressed on the virus surface, is pursued as a vaccine antigen. The F protein exists in two distinct conformations: pre- and post-fusion, but only the pre-fusion conformation is able to induce potent neutralising antibodies. The F protein amino acid sequence is relatively conserved and, unlike influenza, does not require frequent antigenic updating. The second surface-expressed protein is G, which is involved in initial virus attachment, it is highly variable and appears to be non-essential, as viruses without it only have an attenuated phenotype. Therefore, the G protein is not considered as a vaccine antigen. Besides the viral surface antigen F which aims at inducing neutralising antibodies, the conserved nucleo- (N) or matrix-proteins could be considered for cell-mediated immunity inducing vaccines.

The fact that neither natural (13) nor experimental human infection (3) induces robust (i.e. > 6 months) immunity against reinfection, implies that a RSV vaccine is expected to prevent severe disease, rather than provide sterilising immunity. Passive immunisation with Palivizumab, a humanised mouse monoclonal antibody directed against the RSV pre-fusion F protein, is the only treatment option for severe RSV infection (14), as no RSV vaccines currently are available. Palivizumab has a relatively short half-life (about 20 days), and thus, monthly intramuscular injections are required during the RSV season to provide protection. It is also expensive, thus limiting its use to very high risk individuals (e.g., those born extremely prematurely with chronic lung disease of infancy or infants with major congenital cardiac disease) in high-income countries (15).

RSV vaccine development has been hampered by historical results obtained in the late 1960's with formalin-inactivated (FI) RSV vaccines, which increased the risk of severe RSV infection in children (16). This failure is likely due to absence of pre-fusion F protein in FI-RSV vaccines, with the remaining post-fusion F protein inducing only poorly neutralising Ab (17). Moreover, FI-RSV vaccines induce an undesired, potentially dangerous, Th2-biased response (18, 19). Recent advances in structural biology have led to the development of RSV-F protein antigens that are stabilised in the pre-fusion configuration (20, 21) and numerous RSV vaccine candidates are being clinically tested (22).

Cotton rats and mice are widely used as models of RSV infection and have provided insights into mechanisms of immunity to and the pathogenesis of RSV infections. Although cotton rats are semi-permissive for virus replication, they are about 100-fold more permissive than BALB/c mice per inoculum dose of virus, but they do not develop clinical signs of disease (23). Following IN inoculation, RSV replicates to high titres in the nose and lungs, but to lower titres in the trachea. Cotton rats are susceptible to infection throughout life, but virus replication is greater and persists for longer in the nasal passages of 3 day-old rats than in older animals (24, 25). Ferrets can also be used for the study of RSV infection, but only few reports have hitherto been published (26). Bovine RSV (BRSV) in young calves is an alternative model for epidemiology, pathogenesis and vaccine efficacy studies (27). A recent review provides information on RSV infections in Non-Human Primates (NHPs) (27). *grivets* (*Ceropithecus*

*aethiops*) (28), rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) (29), bonnet macaques (*Macaca radiata*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) (18, 30) are all semi-permissive for human RSV infection. Infant, young and adult macaques are all equally sensitive to RSV infection and mount local and systemic immune responses that protects from re-infection (30).

Of the different animal models used in RSV vaccine research, only NHPs have a unique close homology to humans in most components of their immune system (31-33). For instance, similar T and B-cell subsets have been described in NHPs (33). Moreover, the immunoglobulin gene germline repertoire is highly conserved between macaques and humans, which is important when induction of broadly neutralizing antibodies (34, 35). In addition, structure and function of Fc receptors, which are essential for the function of non-neutralizing antibodies, show many homologies between macaques and humans (36). Only very limited information is available on Fc receptors in ferrets or cotton rats and only few reagents for the in-depth analysis of immune responses are available (37). Finally, in NHPs the innate immune system, including molecular pathways and antigen presenting cell subsets, are much more homologous to humans than what is seen in mice (31). NHPs not only most closely reflect the human physiology, but also resemble humans in their clinical symptoms, limited pathology, pattern of viral replication and cytokine and chemokine responses following RSV infection (30). In conclusion, the strong immunological and physiological resemblances to humans make NHPs a unique model in pre-clinical safety, immunogenicity and efficacy evaluation of RSV vaccines.

### 3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

The main objective of this proposal is to evaluate novel RSV vaccine candidates for safety, immunogenicity and protective efficacy following RS-virus infection in macaques. The capacity of new vaccine candidates to elicit durable neutralising immune responses will be evaluated under this project application. The ultimate objective of this project is to develop a RSV vaccine that induces durable protective responses against RSV infection. Vaccines that will be tested in NHP have to be in the final stages of preclinical development and require this final validation step in order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species and that they are effective in an animal species that has an immune system closely related to humans.

The project has two objectives: 1. To evaluate novel RSV vaccine candidates for safety, immunogenicity and protective efficacy following RS-virus infection in macaques using the established RSV-macaque infection model and 2. Establishment of novel RSV infection models using a different challenge strain or route of infection.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

At our institute we have been performing vaccine evaluation studies in NHP for over 20 years. Most vaccine candidates were directed against human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and tuberculosis. Since 2012 we have been working on influenza virus infection in macaques and the evaluation of vaccines against influenza (38-43). We have the appropriate facilities and experience to work with pathogenic viruses, including influenza virus, at DM-3 and ML-3 biosafety conditions. In addition, we have the appropriate immunological assays for assessment of cellular, humoral and innate immune responses against influenza. Our long-standing experience with pathogenic viruses, including influenza, and with vaccine evaluation guarantees that the animal studies describe in this proposal will be adequately performed. RSV vaccine evaluation studies at 10.2.g will be performed in close collaboration with two institutes who have extensive experience in the RSV infection model.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

### 3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Annual RSV epidemics cause considerable morbidity and mortality world-wide and especially affect more vulnerable groups like young children, the elderly and people with underlying diseases. In addition, pregnant women are also considered as RSV vaccine recipients, where trans-placental IgG can confer protection in neonates. The economic impact of RSV disease in adults is estimated to be greater than that of influenza in relation to numbers of days lost from work (10, 11). Currently no RSV vaccines are available and a RSV vaccine that induces durable protection against RSV will contribute to a reduction of RSV morbidity and mortality in (young) children and risk-groups. Thus, a vaccine that confers durable protection against RSV would have great societal impact. Both novel vaccines, for instance in the form of DNA, mRNA or viral vectors, as well as new vaccine delivery methods require evaluation in appropriate animal models so that the level as well as the mechanism of protection can be adequately established, before these new vaccines can be evaluated in clinical studies.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

The stakeholders for an RSV vaccine are the aforementioned target groups (young children, pregnant women, people with underlying diseases and the elderly) for whom protection from RSV infection would increase their quality of life. The vaccination of risk-groups and the resulting decrease in RSV burden would also be of great societal benefit. For the animals as stakeholders, there are no direct benefits and they will experience moderate discomfort as a result of the experimental procedures.

### 3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en beslisriteria.

The criteria to consider vaccine candidates for evaluation are: a) the vaccine strategy must be novel, for instance with regards to choice of antigen, formulation, route of application, that have not been tested before in similar NHPs studies, b) demonstration that the vaccine or vaccine components are non-toxic, c) when specific host molecules are targeted then cross recognition of macaque homologues must have been demonstrated, d) the vaccine cannot be adequately tested in other than NHP animal models, for instance due to the mechanism of action or the type of immunological assessment needed, e) preferably immunogenicity of vaccine candidates should have been proven in other species, unless this is not possible because the specific vaccine modality used does not work in other species. This concerns only vaccines for which it is not possible to directly evaluate them in other species because interaction with specific host molecules is required that are only present in humans and in NHPs, but not in other species. In this case, we would like to add the additional requirement that for this type of vaccine a similar vaccine strategy that targets slightly different molecules but uses the same mode of action has been evaluated and found to be immunogenic in other species.

In order to evaluate the safety and immunogenicity of the vaccine concept, a vaccine evaluation experiment will be performed according to well established procedures, as described in appendix 1. Typically, one or a number of immunisations are given over a certain time period. Following immunisation induction of T-cell and antibody immune responses are measured, systemically in the blood as well as locally in the upper and lower respiratory tract. The strength of these responses as well as their duration are determined. Subsequently, the capacity of the vaccine to protect against infection is evaluated by experimental infection of the animals with RSV. For RSV infection we will use a macaque adapted RSV strain (18, 29), shown to be infectious in macaques.

Experimental infection will only be performed when the immunisation has induced immune responses against the virus that is to be used for experimental infection, such that protection against infection is to be expected. Whether protection is actually achieved depends on local interaction between cells of the immune system and local anti-viral antibodies with the virus and virus infected cells in the respiratory tract. This cannot be adequately modelled in an in vitro system and requires experimental infection of an animal. Ideally the vaccine should provide a robust level of protection and be able to reduce disease and virus replication in animals infected with a standard virus dose via delivery to the upper respiratory tract



and lungs. However, since most people become infected via exposure to small droplets containing a limited amount of virus, a less stringent infection model; i.e. using a low dose of virus given via aerosol delivery, may sometimes be chosen. In the event evaluation of the capacity of a vaccine to protect against infection requires that a virus has to be used that has not been tested before in macaques, then this virus will first be tested in a small number of animals to determine if all animals become infected and what the amount of virus replication is (appendix 2). Virus infection is routinely performed by inoculating the animals via a number of routes or combinations thereof; i.e. intra-tracheal, oral or intranasal, using a standard virus dose. For refinement, we will investigate another mode of virus delivery, namely as an aerosol. The rationale for setting up this model of infection is that the virus is given in the form of small droplets that better reflect the natural mode of exposure. Once this method is established for RSV infection, it can be applied in subsequent vaccine evaluation studies, for instance in cases where less stringent criteria of protection against infection are needed (in case it is difficult to make a protective vaccine and it is necessary to establish relatively modest improvements in vaccine development that can only be measured when a low dose of virus is used).

#### 3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

The main objective can be divided in 2 sub- objectives:

Vaccine evaluation: Safety, immunogenicity and capacity to protect against infection will be evaluated using an established RSV infection model. The challenge virus to be used in the initial vaccine efficacy studies is a, well described, macaque-adapted human RSV isolate, shown to reproducibly infect macaques (18, 29).

Establishment of a new RSV infection model: In the event a new RSV strain is required for vaccine evaluation, the infection model will be optimised for dose and route of administration (e.g. i.t., oral, i.n. or aerosol delivery) in order to optimally assess vaccine efficacy. When aerosol administration for the macaque-adapted RSV challenge strain the challenge dose will have to be established.

In the event that the established macaque-adapted RSV challenge model will be used, this can be performed under sub-objective 1. If, however, a new challenge virus has to be used for vaccine evaluation, two steps are required: The infection model has to be established (sub-objective 2), before the vaccine can be evaluated. Therefore, two types of experiments are required to fulfil these objectives: 1. Vaccine evaluation experiments (described in appendix 1) and 2. Establishment of a new RSV challenge model (described in appendix 2).

##### *Vaccine evaluation in macaques.*

For this type of experiment animals will be immunised by a number of immunisations over a defined time period. During the study animals will be monitored for adverse effects of the vaccine, including monitoring of general behaviour and health. Blood, nasal washes and bronchoalveolar lavages will be collected to determine induction of systemic as well as local immune responses. Only if immune responses, suggesting protection against infection, are induced the efficacy will be tested by experimental infection with RSV. A group of control animals will be included for comparison. This control group can be unvaccinated, or be previously RSV-infected. A group of previously infected animals may be included as a control group to compare infection- and vaccine-induced immune responses with regards to protective efficacy and longevity. The choice of the control groups depends on the research question.

##### *RSV infection in macaques.*

In order to establish infectivity and potential pathogenicity of a virus that has not been tested previously in NHP, a small number of animals will be infected and monitored for clinical symptoms, fever, body weight and changes in blood parameters. Nasal and tracheal swabs and lung lavages will be taken to confirm that the animals were infected and to determine virus replication. To evaluate a new virus or a different infection route, the virus is inoculated via the desired route, using a standard virus dose. Proper application in vaccine evaluation requires that in these infection studies > 80% of the animals become infected and that the amount of virus produced in the respiratory tract over the infection period is clearly detectable and that the variation between the animals is sufficiently low to allow measurement of reduction in virus load in vaccinated animals with less than 10 animals per group. In case these parameters are not achieved, the experiment will be repeated with a 10-100 times higher dose. The challenge virus under investigation will be dropped if the required group size is more than 10 animals. In



case any of the animals reaches the humane endpoint within the first four days after infection then a 10-100 times lower virus dose will be evaluated. The same criteria will be applied to determine whether the aerosol infection model is sufficiently robust.

3.4.3 Benoem de type dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	RSV vaccine evaluation in macaques
2	RSV infection in macaques

## Referenties

1. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9725):1545-55.
2. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet*. 2017.
3. Hall CB, Walsh EE, Long CE, Schnabel KC. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*. 1991;163(4):693-8.
4. Fauroux B, Simoes EAF, Checchia PA, Paes B, Figueras-Aloy J, Manzoni P, et al. The Burden and Long-term Respiratory Morbidity Associated with Respiratory Syncytial Virus Infection in Early Childhood. *Infect Dis Ther*. 2017;6(2):173-97.
5. Falsey AR, Walsh EE. Viral pneumonia in older adults. *Clin Infect Dis*. 2006;42(4):518-24.
6. Hall CB, Simoes EA, Anderson LJ. Clinical and epidemiologic features of respiratory syncytial virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;372:39-57.
7. Chemaly RF, Shah DP, Boeckh MJ. Management of respiratory viral infections in hematopoietic cell transplant recipients and patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis*. 2014;59 Suppl 5:S344-51.
8. Lee N, Lui GC, Wong KT, Li TC, Tse EC, Chan JY, et al. High morbidity and mortality in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections. *Clin Infect Dis*. 2013;57(8):1069-77.
9. Malosh RE, Martin ET, Callear AP, Petrie JG, Luring AS, Lamerato L, et al. Respiratory syncytial virus hospitalization in middle-aged and older adults. *J Clin Virol*. 2017;96:37-43.
10. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1749-59.
11. Fleming DM, Elliot AJ. Respiratory syncytial virus: a sleeping giant? *The European respiratory journal*. 2007;30(6):1029-31.
12. Lee WJ, Kim YJ, Kim DW, Lee HS, Lee HY, Kim K. Complete genome sequence of human respiratory syncytial virus genotype A with a 72-nucleotide duplication in the attachment protein G gene. *J Virol*. 2012;86(24):13810-1.
13. Henderson FW, Collier AM, Clyde WA, Jr., Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med*. 1979;300(10):530-4.
14. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMPact-RSV Study Group. *Pediatrics*. 1998;102(3 Pt 1):531-7.
15. PHE. Green Book, Chapter 27a Respiratory Syncytial Virus [Available from: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/458469/Green\\_Book\\_Chapter\\_27a\\_v2\\_OW.PDF](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/458469/Green_Book_Chapter_27a_v2_OW.PDF)].
16. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, Pyles G, Chanock RM, Jensen K, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol*. 1969;89:422-34.
17. Killikelly AM, Kanekiyo M, Graham BS. Pre-fusion F is absent on the surface of formalin-inactivated respiratory syncytial virus. *Sci Rep*. 2016;6:34108.

18. De Swart RL, Kuiken T, Timmerman HH, van Amerongen G, Van Den Hoogen BG, Vos HW, et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) induces interleukin-13-associated hypersensitivity to subsequent RSV infection. *J Virol*. 2002;76(22):11561-9.
19. Moghaddam A, Olszewska W, Wang B, Tregoning JS, Helson R, Sattentau QJ, et al. A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines. *Nat Med*. 2006;12(8):905-7.
20. McLellan JS, Chen M, Joyce MG, Sastry M, Stewart-Jones GB, Yang Y, et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science*. 2013;342(6158):592-8.
21. McLellan JS, Chen M, Leung S, Graepel KW, Du X, Yang Y, et al. Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science*. 2013;340(6136):1113-7.
22. PATH. RSV vaccine snapshot [Available from: <https://www.path.org/resources/rsv-vaccine-and-mab-snapshot/>].
23. Byrd LG, Prince GA. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Clin Infect Dis*. 1997;25(6):1363-8.
24. Prince GA, Jenson AB, Horswood RL, Camargo E, Chanock RM. The pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *Am J Pathol*. 1978;93(3):771-91.
25. Lemon K, Nguyen DT, Ludlow M, Rennick LJ, Yuksel S, van Amerongen G, et al. Recombinant subgroup B human respiratory syncytial virus expressing enhanced green fluorescent protein efficiently replicates in primary human cells and is virulent in cotton rats. *J Virol*. 2015;89(5):2849-56.
26. Stittelaar KJ, de Waal L, van Amerongen G, Veldhuis Kroeze EJ, Fraaij PL, van Baalen CA, et al. Ferrets as a Novel Animal Model for Studying Human Respiratory Syncytial Virus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Hosts. *Viruses*. 2016;8(6).
27. Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine*. 2017;35:469-80.
28. Ispas G, Koul A, Verbeeck J, Sheehan J, Sanders-Bear B, Roymans D, et al. Antiviral Activity of TMC353121, a Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Inhibitor, in a Non-Human Primate Model. *PLoS One*. 2015;10:e0126959.
29. Grunwald T, Tenbusch M, Schulte R, Raue K, Wolf H, Hannaman D, et al. Novel vaccine regimen elicits strong airway immune responses and control of respiratory syncytial virus in nonhuman primates. *J Virol*. 2014;88:3997-4007.
30. Grandin C, Lucas-Hourani M, Clavel M, Taborik F, Vabret A, Tangy F, et al. Evidence for an intranasal immune response to human respiratory syncytial virus infection in cynomolgus macaques. *J Gen Virol*. 2015;96:782-92.
31. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004;172(5):2731-8.
32. Jacobsen FW, Padaki R, Morris AE, Aldrich TL, Armitage RJ, Allen MJ, et al. Molecular and functional characterization of cynomolgus monkey IgG subclasses. *J Immunol*. 2011;186:341-9.
33. Demberg T, Robert-Guroff M. B-Cells and the Use of Non-Human Primates for Evaluation of HIV Vaccine Candidates. *Curr HIV Res*. 2015;13(6):462-78.
34. Link JM, Hellinger MA, Schroeder HW, Jr. The Rhesus monkey immunoglobulin IGHD and IGHJ germline repertoire. *Immunogenetics*. 2002;54:240-50.
35. Sundling C, Li Y, Huynh N, Poulsen C, Wilson R, O'Dell S, et al. High-resolution definition of vaccine-elicited B cell responses against the HIV primary receptor binding site. *Sci Transl Med*. 2012;4(142):142ra96.
36. Hogarth PM, Anania JC, Wines BD. The FcγR2b of humans and non-human primates and their interaction with IgG: implications for induction of inflammation, resistance to infection and the use of therapeutic monoclonal antibodies. *CurrTopMicrobiolImmunol*. 2014;382:321-52.
37. Albrecht RA, Liu WC, Sant AJ, Tompkins SM, Pekosz A, Meliopoulos V, et al. Moving Forward: Recent Developments for the Ferret Biomedical Research Model. *mBio*. 2018;9(4).
38. 10.2.e
39. 10.2.e

10.2.e

40. 10.2.e

41. 10.2.e

42. Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, Wagner MV, Zhu X, Hoffman RM, et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science*. 2015;349:1301-6.

43. 10.2.e



## 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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

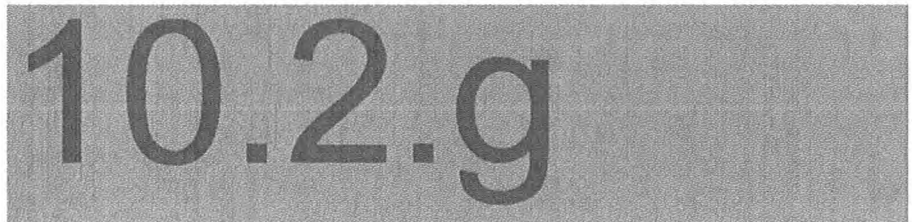
### 1 General information

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

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 List the serial number and type of animal procedure

*Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.*



Serial number	Type of animal procedure
1	RSV vaccine evaluation in macaques

### 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.



We have developed a general study protocol for the evaluation of RSV vaccines in macaques. Typically a recording device is surgically placed in the abdominal cavity before the start of the study to retrospectively evaluate body temperature (measured every 15 minutes) and/or heart rate, respiration and activity. Subsequently the animals are immunised either once or receive a number of immunisations over a certain time period. Although the vaccines to be used in these studies have already been extensively evaluated in other animals and therefore are expected to give no or only very limited adverse effects, macaques will be monitored for possible changes in general behaviour and health. The immunisation site will be inspected for local reactions and blood will be drawn to measure clinical chemistry and haematology parameters. Before, between and after immunisations, blood and occasionally nasal samples (either swabs or washes) or lung lavages will be collected to measure induction of systemic as well as local immune responses. Both T-cell and antibody responses will be determined against several RSV antigens in order to establish the strength and durability of the ensuing immune response. When adequate immune responses are induced that indicate that protection against infection might be achieved, the efficacy against infection will be tested by experimental infection with RSV. Whether an immune response is adequate depends on the nature of the vaccine under investigation; for antibody responses this can be assessed by comparison with data obtained in clinical trials, whereas for cell-mediated immune responses on few data are available and adequacy of the response will be assessed by comparison with published data where possible. A group of non-vaccinated animals will be included as infection controls. In addition, a group of RSV infected animals may also be included, such that the vaccine under evaluation can be compared with natural RSV infection. We will use a well-established RSV infection model using a macaque-adapted human RSV strain, as described in appendix 2 (1-3). In the event, the vaccine candidate requires testing with a different RSV strain, or aerosol-infection, the infection model will be established at 10.2.g as described in appendix 2. All animals in a specific vaccine group will be challenged with the same virus as described in appendix 2.

The primary outcome parameters are: absence of unexpected reactogenicity of the vaccine; effects of the vaccine on general behaviour, health, local reactions and blood parameters. Immunogenicity: induction of cellular and humoral immune responses. The type and strength of the induced responses will determine if the objectives of the vaccine strategy are achieved and whether immune responses are sufficiently strong to proceed with viral challenge. Efficacy: capacity to protect against viral challenge will be established in terms of: reduction in clinical symptoms, fever, virus replication and changes in blood parameters.

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

A recording device is surgically placed in the abdominal cavity at least 4 weeks before the first immunisation takes place. This time frame is necessary for full recovery of the animals and to allow adequate recording of body temperature and/or heart rate, breathing rate and activity during a two to three-week period to establish normal values before immunisations start. Animals will receive one or more immunisations, typically at 4 to 8-week time intervals. Occasionally a longer time frame is needed between immunisations when different vaccine modalities are used for priming and boosting of the immune response. Usually 3 immunisations suffice over a period of 24 weeks. However, in rare occasions these limits may have to be exceeded. Specific rationale will then be presented to the animal welfare body (AWB). Immunisations can be done by several routes (e.g. intradermal injection, intramuscularly, subcutaneously, intravenously, intranasally, intra-tracheally, or via aerosol using a nebulizer). The route of immunisation depends on the vaccine under investigation. All vaccines have to be sterile and have to be given under aseptic conditions. At regular time intervals, usually before, two and four weeks after every immunisation, blood is drawn to measure systemic adverse effects, which includes measurement of clinical chemistry and haematology, and to measure induction of cellular and humoral immune responses. The two-week interval after immunisation is chosen, because this is optimal for measuring cellular immune responses, while four weeks is optimal for measuring humoral immune responses. For new vaccine candidates aiming at the induction of mucosal responses, nasal washes and bronchoalveolar lavages (BAL) will be collected before and at time points (usually 2 and 4 weeks) after immunisation to determine the magnitude of local immune responses. Immune responses recorded after the final immunisation will be used to decide whether protection against viral challenge can be reasonably expected. If these responses are too low to realistically expect protection the study will be stopped and animals may be re-used in other non-RSV related experiments. Otherwise, experimental challenge will usually take place between 4 and 8 weeks after the last immunisation, but this may be longer when the longevity of protective responses is being evaluated. This time period is also required to allow immunological memory to form after the last immunisation. RSV infection may be done by intra-nasal, intra-tracheal or intra-broncheal inoculation alone or in combination with oral, intranasal and intraocular inoculation or via aerosol using a nebulizer (as described in appendix 2). The established infection routes for RSV infection using the macaque-adapted virus are intra-nasal and intra-tracheal using a challenge dose ranging between  $10^5$  and  $10^6$  TCID<sub>50</sub>, at which all animals became infected (1, 3). Different vaccine concepts or research questions may, however, require other challenge viruses or infection routes that need to be established before vaccine evaluation can be performed (described in appendix 2). Clinical symptoms will be monitored twice daily during the infection phase. Nasal and tracheal swabs will be taken before infection, frequently during the first days after infection (daily and then every other day) and subsequently less frequently until day 21, to measure virus replication in the upper airways. Bronchoalveolar lavages (BAL) may be taken at selected time points (max 4 times post infection) to measure virus replication in the lungs, as previously described (1, 3, 4). Blood is collected simultaneously with the swabs, to monitor changes in clinical chemistry and haematology parameters, leucocyte subsets and cytokine production. At the same time points body weight and physiological parameters (e.g. pulse rate, respiratory rate, blood pressure) are recorded and imaging (CT or PET-CT) is performed to measure lung infiltration. After the virus is cleared (usually 21 days post infection) animals are either returned to the experimental stock or they are euthanised and a full necropsy is performed in order to establish whether persistent lung pathology occurred (1). Euthanasia is only performed when assessment of lung pathology is required to establish vaccine safety. In case an animal should reach the humane endpoint during the study it will be immediately euthanised and a full necropsy will be performed to establish cause of death and investigate lung pathology and virus presence in the respiratory tract. In case animals will not be euthanised, the recording devices are surgically removed and body temperature, heart rate, respiratory rate and activity data are analysed, upon which, the animals may be re-used (within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven). The details of each study, regarding the interval between the immunisations, the number and time points of sampling, the specific criteria to proceed with a viral challenge, the time interval between the last immunisation and viral challenge will depend on the actual type of vaccine that is being tested and this will be submitted to the AWB.

Table. Maximum number of repeats per procedure.

Procedure	Maximum Duration
Sedation	24 15-60 min
Recorder in / out	2 60 min
Vaccination	4 60 min
Blood sample	16 30 min
Bronchoalveolar lavage (BAL)	16 60 min
Infection	2 30 min
Virus load small BAL & Swabs	12 60 min
CT-Scan	8 30 min

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 will be based on statistical power analysis. Calculations take into account the number of animals needed to measure statistically significant induction of immune responses in relation to (unvaccinated) controls. In addition, calculations are performed to establish the number of animals needed to obtain a significant reduction in the primary outcome measure (throat or BAL virus load) between the vaccine groups and the challenge control group. Experience in RSV vaccine evaluation studies indicate that statistically significant reductions in virus replication can be obtained with five animals per group (3). In the event two different vaccines are compared or a vaccine is compared to previously RSV infected animals, group sizes may be larger. Only the minimum number of animals needed will be used.

#### B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Rhesus or cynomolgus macaque	Purpose bred	adult	90	M / F	Not applicable	Not applicable

Provide justifications for these choices

Species	Macaque species have been used in several RSV vaccine studies (1-3). The most frequently used species are the rhesus monkey ( <i>Macaca mulatta</i> ) and cynomolgus macaque ( <i>Macaca fascicularis</i> ). Both species are semi-permissive to RSV infection. It was shown that both rhesus and cynomolgus macaques (infant, young and adult) are equally susceptible to (macaque-adapted) RSV infection (1, 3, 5). Therefore, both rhesus and cynomolgus macaques can be used for RSV vaccine evaluation studies. There is no specific preference for rhesus or cynomolgus macaques. As both species are suitable, the choice of species depends on availability. In some cases the choice of species is determined by other factors (e.g. availability of specific reagents or comparison with other studies).
Origin	All animals are purpose bred. They are either bred at our institute or obtained from a certified supplier.
Life stages	Adult animals will be used because infant, young and adult animals are equally susceptible to (macaque-adapted) RSV infection (1, 3, 5)
Number	The number of animals requested is based on the assumption that each study will contain two vaccine groups and 1 control group, with 10 animals per group. The actual group sizes will be determined per experiment, based on a power calculation for each experiment. Probably fewer than the assumed 10 animals per group will be needed in most experiments. In all, we anticipate performing 3 such studies over a 5-year period, the total number of animals needed will be maximally 90

Gender	Adult male and female animals can be used. Since there are immunological differences between males and females (6, 7), we prefer that for each individual experiment either all animals are male or all are female, in order to minimise the variation within the experimental test group, thereby increasing the probability of finding statistically significant differences between the experimental groups. This choice is also important with regard to the amount of blood needed to perform all assays. Male animals are usually larger than female animals and therefore more blood per time point can be drawn from males. In case assays need to be performed which consume large amounts of blood, male monkeys are preferred over females.
Genetic alterations	Not applicable
Strain	Not applicable

### C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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.

After placement of the recording device in the abdomen and after removal, which is needed in case the animal will not be euthanised after completion of the experiment, animals will receive analgesics for as long as necessary, typically 3 days. In previous studies we have observed that animals can experience some body temperature elevation during the first days after insertion of the recording device, but have recovered very well within 1 week after the operation. Pain relieve will also be applied when substantial induration is seen at the site of vaccine injection. In case of the latter, analgesics known not to interfere with the induction of the vaccine response will be used.

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

1. Discomfort because of insertion or removal of the temperature recording device
2. Discomfort due to injection
3. Discomfort due to lung lavages
4. Discomfort due to virus installation
5. Discomfort due to CT-scans
6. Stress because of sedation and recovery
7. Reduced food intake during the first days after infection
8. Disease symptoms due to the infection

Explain why these effects may emerge.



1. The surgery needed for insertion and removal of the temperature recording device will cause pain and some local inflammation.
2. When vaccines are given by injection, this can cause local pain and irritation.
3. For the lung lavages a bronchoscope is used. Insertion will cause irritation.
4. When virus is given intra-bronchially a bronchoscope is used and this combined with the inoculum volume will cause irritation. Aerosol application implies that animals have to be sedated and forced to breathe via a nebulizer device and this can give irritation.
5. Animals will be repeatedly sedated for vaccine delivery, blood sampling, virus infection, collection of swabs and lung lavages. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
6. See 5.
7. Especially during daily sedation during the first 2 days after infection food intake might be reduced.
8. RSV infection can cause fever, coughing, sneezing, nose discharge, laboured breathing, increased breathing rate, loss of appetite, inactivity.

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

1. Surgery will be done under anaesthesia and after surgery analgesics will be applied.
2. Animals will be sedated for vaccine delivery. Only rarely are strong adverse effects seen. Should granuloma formation be observed, then the animal will be sedated, the wound will be cleaned and analgesics are applied if necessary following veterinary consultation.
3. For the lung lavages animals are first deeply sedated and then receive a local muscle relaxant.
4. The same procedure as described under 3 will be followed.
5. Recovery of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.
6. See 5.
7. Animals will receive tube feeding. This is applied during sedation.
8. Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached then the animal will be humanely euthanised and a full necropsy will be performed to establish the cause of the disease and viral distribution over the respiratory tract.

#### **E. 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 F

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

Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms (8). When a clinical score of 35 is reached this indicates that the maximum duration of severity is reached then the animal will be humanely euthanised. Individual scores are added and the decision is based on the total daily score and veterinarian assessment of discomfort. Symptoms that lead to an immediate endpoint are: open mouth breathing or cyanosis, lethargy as defined by minimal response to human approach.

Indicate the likely incidence.

The percentage of animals reaching the end point will depend on the virus and the challenge dose used. Most RS viruses, including the macaque-adapted human-RSV strain, will only cause minimal disease and typically resolve within 14-21 days (3). In the event another than the macaque-adapted human-RSV strain will be used or when challenge route and / or dose require adaptation, this will first be evaluated in a small number of animals (see appendix 2). Weight will be recorded during the study, but a weight loss of 10% because of the infection has not been observed in any study described thus far and therefore cannot serve as a suitable end point.

#### **F. Classification of severity of procedures**

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

The total amount of discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the surgical implantation and removal of the recording device and development of disease due to infection.

### G. 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	<p>The immune system is very complex and the in vivo interactions between virus and/or vaccine and host are not completely understood. At present there is no in vitro model available that can mimic the human immune system sufficiently to study the potential of a vaccine to induce protective immune responses. Due to the complex interaction of RSV with different tissues and the role of local immunity in eradication of the virus, the efficacy of an RSV vaccine to protect against infection can only be adequately established in an animal model.</p> <p>Several animal species have been used as a model for RSV infection (9). However, mice are only susceptible to high RSV challenge doses. Cotton rats and ferrets are also semi-permissive to RSV and recapitulate the natural course of infection. However, these models have the disadvantage that limited immunological tools are available, especially to study innate and cellular adaptive immune responses, which are especially important in the evaluation of vaccine strategies (10). NHP have an immune system that most closely resembles that of humans. Also the availability of many cross reactive reagents makes it possible to study in detail the contribution of the innate immune system and to analyse vaccine induced (local) immune responses and evaluate their role in control of infection. In addition, vaccine strategies that aim to trigger immune responses through targeting of specific cell surface molecules or innate immune receptors have either limited cross reactivity to other animal species or trigger different cell types or different responses because of differences in receptor expression pattern or cell signalling pathways. These aspects are essential for the evaluation of RSV vaccines. For these type of vaccines new vaccination strategies as well as vaccine modalities are used that aim for the induction of protective cellular immune responses or induction of neutralising antibody responses or non-neutralising antibody responses that become effective through interaction with innate immune cells. Here, the close homology between the immune system in NHP and humans is essential for proper induction and adequate analysis of these responses, allowing a better extrapolation to the human situation. Vaccines that will be tested in NHP have to be in the final stages of preclinical development and require this last validation step in order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species and that they are effective in an animal species that has an immune system closely related to humans.</p>
Reduction	<p>The number of animals needed per experiment will be based on statistical power calculation for achieving statistically significant induction of immune responses and a significant reduction in virus load in the respiratory tract between the vaccine groups and the challenge control group. Only the minimum number of animals needed will be used. Furthermore, we aim to evaluate multiple vaccine candidates in a single experiment, so that a single challenge control group can be used. This has to be weighed against the fact that in order to obtain significant differences in immune response between the vaccine groups, more animals per vaccine group may occasionally be required.</p>

Refinement	<p>The use of recording devices enables the monitoring of body temperature, heart- and breathing-rate every 15 minutes. We have designed a method that allows very precise calculation of fever induction caused by influenza infection (11). With this method we have observed a significant reduction in fever by influenza vaccine candidates (12). Such precise measurements are not possible with the traditional rectal temperature measurement. In addition, measurement of breathing rate may provide additional information on the RSV infection severity. Placement and removal of the temperature responders will require a small surgical procedure, which will be done under anaesthesia. Subsequently, animals will receive analgesics as long as required. Animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation.</p> <p>Animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation. Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for enrichment in our institute that consists of playing material and methods to present food</p> <p>10.2.g</p> <p>During the study animals will be observed daily by qualified and competent animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool then a veterinarian will be informed and measures will be discussed with the investigator and implemented. Possible local reactions on the injection site of the vaccine will be recorded at multiple time points using a scoring system that includes redness, swelling and induration. In case substantial induration is seen, then the wound will be treated and analgesics will be applied. During the infection phase, animals will be observed twice daily and clinical symptoms will be scored using a well-established clinical scoring list adapted from Brining et al.(8). On the basis of the scoring system a humane endpoint is defined. In addition, a sudden strong decrease in body temperature is taken as a humane endpoint. When this endpoint is reached the animal will be immediately euthanized and a full necropsy will be performed to determine the cause of clinical disease. All handlings will be performed under sedation. On every time point where a handling is performed the animal will be weighed and closely examined. During the first 2 days of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, since animals will be sedated daily during the first days after infection and the food intake during this period would otherwise be very limited. The "Flora and Fauna wet" and "wet dieren" do not pose additional requirements that are needed for the type of studies proposed in this application.</p>
------------	---

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

#### H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous RSV vaccine or RSV virus infection studies or that have pre-existing antibodies against RSV are not suitable. In view of the long life-span of the animals of this species re-use of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.

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.

### I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable

### J. 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 K.

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.

## End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

In most studies the animals will be re-used after the virus is cleared (usually at day 21 after infection). However, in cases where possible adverse effects of the vaccine have to be studied animals are humanely euthanised and a full necropsy is performed.

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 > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Euthanasia is done by injection of an anaesthetic dose of ketamine followed by an overdose of barbiturate intravenously

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.


If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Not applicable

### References

1. De Swart RL, Kuiken T, Timmerman HH, van Amerongen G, Van Den Hoogen BG, Vos HW, et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) induces interleukin-13-associated hypersensitivity to subsequent RSV infection. *J Virol.* 2002;76(22):11561-9.
2. de Waal L, Wyatt LS, Yuksel S, van Amerongen G, Moss B, Niesters HG, et al. Vaccination of infant macaques with a recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the respiratory syncytial virus F and G genes does not predispose for immunopathology. *Vaccine.* 2004;22(8):923-6.



3. Grunwald T, Tenbusch M, Schulte R, Raue K, Wolf H, Hannaman D, et al. Novel vaccine regimen elicits strong airway immune responses and control of respiratory syncytial virus in nonhuman primates. *J Virol*. 2014;88:3997-4007.
4. Schultheiss T, Stolte-Leeb N, Sopper S, Stahl-Hennig C. Flow cytometric characterization of the lymphocyte composition in a variety of mucosal tissues in healthy rhesus macaques. *J Med Primatol*. 2011;40(1):41-51.
5. Grandin C, Lucas-Hourani M, Clavel M, Taborik F, Vabret A, Tangy F, et al. Evidence for an intranasal immune response to human respiratory syncytial virus infection in cynomolgus macaques. *J Gen Virol*. 2015;96:782-92.
6. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:626-38.
7. Klein SL, Marriott I, Fish EN. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;109(1):9-15.
8. Brining DL, Mattoon JS, Kercher L, Lacasse RA, Safronetz D, Feldmann H, et al. Thoracic radiography as a refinement methodology for the study of H1N1 influenza in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Comp Med*. 2010;60:389-95.
9. Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine*. 2017;35:469-80.
10. Albrecht RA, Liu WC, Sant AJ, Tompkins SM, Pekosz A, Meliopoulos V, et al. Moving Forward: Recent Developments for the Ferret Biomedical Research Model. *mBio*. 2018;9(4).
11. 10.2.e  

12. Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, Wagner MV, Zhu X, Hoffman RM, et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science*. 2015;349:1301-6.



## Appendix Description animal procedures

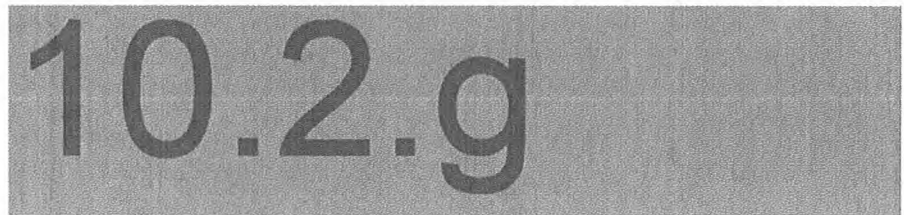
- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for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

### 1 General information

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

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 List the serial number and type of animal procedure



Serial number	Type of animal procedure
2	Establishment of a new RSV infection model in macaques

*Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.*

### 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.

In order to establish the protective efficacy of an RSV vaccine, a well-defined RSV infection model is required. We will use a well-established RSV macaque infection model using a macaque-adapted human RSV virus (1-3). When a different new challenge virus is used, or the administration route is changed, it is necessary to establish the infectivity and potential pathogenicity of these changes in macaques before the model can be applied in RSV vaccine efficacy studies. To evaluate a new virus or alternative infection route, the virus is inoculated using a standard dose ( $10^5 - 10^7$  TCID<sub>50</sub>). Proper application for vaccine evaluation requires that more than 80% of the animals become infected and that the amount of virus produced in the respiratory tract over the infection period is clearly measurable and that the variation between the animals is sufficiently low to allow measurement of reduction in virus load in vaccinated animals with less than 10 animals per group. In case these parameters are not achieved, the experiment will be repeated with a 10-100 times higher dose. In case any of the animals reaches the clinical endpoint within the first four days after infection, a 10-100 times lower virus dose will be evaluated. The challenge virus under investigation will be dropped if the required group size is more than 10 animals. Infant, young and adult macaques are all equally sensitive to RSV infection and mount local and systemic immune responses that protects from re-infection (4).

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

A recording device is surgically placed in the abdominal cavity at least 4 weeks before the infection. This time frame is necessary for full recovery of the animals and to allow adequate recording of body temperature, respiratory rate and activity during a two to three week period to establish baseline values before infection. For the established RSV infection model with the macaque-adapted virus two infection routes have been used, namely intra-nasal (2) and intra-tracheal (just below the larynx) (1) using a dose of  $10^5 - 10^6$  TCID<sub>50</sub>. Using the aforementioned routes and doses all (control) animals became infected (1, 2). In the event a new challenge virus is required for vaccine evaluation, this model needs to be validated: i.e. route of infection and challenge dose need to be established. Clinical symptoms will be monitored twice daily. Nasal and tracheal swabs will be taken before infection, frequently during the first days after infection (daily and then every other day) and subsequently less frequently until day 21, to measure virus multiplication in the upper airways. Small volume (3 mL) bronchoalveolar lavages (BAL) may be taken at selected time points pre- and post-infection (max 6 times) to determine virus replication in the lungs. Blood is collected simultaneously with the swabs, to monitor changes in clinical chemistry and haematology parameters and leucocyte subsets. At the same time points body weight and physiological parameters are recorded and imaging (CT or PET-CT, max 4 times per infection) is performed to measure lung infiltration. After the virus is cleared (usually at day 21 after infection) animals are either returned to the experimental stock or they are euthanised and a full necropsy is performed in order to investigate lung pathology and virus replication in the different parts of the respiratory tract. However, when animals are not yet virus negative at day 21 an additional tracheal swab or BAL will be taken at day 28. When that is also virus positive, which is very unlikely, the animals will be euthanised in order to preclude further discomfort. In case an animal should reach the humane endpoint during the study it will be immediately euthanised and a full necropsy will be performed to establish lung pathology and virus replication in the respiratory tract. In case animals are returned to the experimental stock the recording devices are surgically removed and body temperature and/or respiratory rate and activity data are analysed. The details of each study, regarding the route of infection, dose used, species and whether animals are to be euthanised at the end of the study will be submitted for approval to the AWB.

Table. Maximum number of repeats per procedure.

Procedure	Maximum	Duration
Sedation	12	30-60 min
Recorder in / out	2	60 min
Infection	1	30 min
Blood sample	8	30 min
Virus load small BAL & Swabs	6	60 min
CT-Scan	4	30 min

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

Experience in the RSV macaque infection model has shown that with a number of four animals an adequate assessment can be made on the reproducibility of infection (2) (all 4 animals need to show virus replication in the respiratory tract). The variability of outcome parameters like: virus production and physiological parameters (fever induction, breathing frequency) needs to be limited. The primary outcome measure will be throat or BAL virus load in most experiments. On the basis of these data a power calculation can be made concerning the number of animals needed in a vaccine evaluation study. Should the result of these calculations be that more than 10 animals are needed per group or should not all four animals have become infected, a new experiment with 4 animals is needed with a higher virus dose.

### B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	Rhesus or cynomolgus macaque	Purpose bred	adult	16	M / F	Not applicable	Not applicable

Provide justifications for these choices

Species	Macaque species have been used in several RSV vaccine studies (1-3). The most frequently used species are the rhesus monkey ( <i>Macaca mulatta</i> ) and cynomolgus macaque ( <i>Macaca fascicularis</i> ). Both species are semi-permissive to RSV infection. It was shown that both rhesus and cynomolgus macaques (infant, young and adult) are equally susceptible to (macaque-adapted) RSV infection (1, 2, 4). Therefore, both rhesus and cynomolgus macaques can be used for RSV vaccine evaluation studies. There is no specific preference for rhesus or cynomolgus macaques. As both species are suitable, the choice of species depends on availability. In some cases the choice of species is determined by other factors (e.g. availability of specific reagents or comparison with other studies).
Origin	All animals are purpose bred. They are either bred at our institute or obtained from a certified supplier.
Life stages	Adult animals will be used because infant, young and adult animals are equally susceptible to (macaque-adapted) RSV infection (1, 2, 4)
Number	Assuming group sizes of 4 animals, evaluation of 2 new viral stains, which 2 have to be tested at two doses, the total number of animals needed will be maximally 16 over a period of 5 years.
Gender	Adult male and female animals can be used. Since there are immunological differences between males and females (5, 6), we prefer that for each individual experiment either all animals are male or all are female, in order to minimise the variation within the experimental test group, thereby increasing the probability of finding statistically significant differences between the experimental groups. This choice is also important with regard to the amount of blood needed to perform all assays. Male animals are usually larger than female animals and therefore more blood per time point can be drawn from males. In case assays need to be performed which consume large amounts of blood, male monkeys are preferred over females.
Genetic alterations	Not applicable
Strain	Not applicable

### C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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.



After placement of the recording device in the abdomen and after removal, which is needed in case the animal will not be euthanised after completion of the experiment, animals will receive analgesics for as long as necessary, typically 3 days. In previous studies we have observed that animals can experience some body temperature elevation during the first days after insertion of the recording device, but have recovered very well within 1 week after the operation. Pain relieve will also be applied when substantial induration is seen at the site of vaccine injection. In case of the latter, analgesics known not to interfere with the induction of the vaccine response will be used.

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

1. Discomfort because of insertion or removal of the temperature recording device
2. Discomfort due to lung lavages
3. Discomfort due to virus installation
4. Discomfort due to CT-scans
5. Stress because of sedation and recovery
6. Reduced food intake during the first days after infection
7. Disease symptoms due to the infection

Explain why these effects may emerge.

1. The surgery needed for insertion and removal of the temperature recording device will cause pain and some local inflammation.
2. For the lung lavages a bronchoscope is used. Insertion will cause irritation.
3. When virus is given intra-bronchially a bronchoscope is used and this combined with the inoculum volume will cause irritation. Aerosol application implies that animals have to be sedated and forced to breathe via a nebulizer device and this can give irritation.
4. Animals will be repeatedly sedated for vaccine delivery, blood sampling, virus infection, collection of swabs, imaging and lung lavages. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
5. See 4.
6. Especially during daily sedation during the first 2 days after infection food intake will be reduced.
7. RSV infection can cause fever, coughing, sneezing, nose discharge, laboured breathing, loss of appetite, inactivity.

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

1. Surgery will be done under anaesthesia and after surgery analgesics will be applied.
2. For the lung lavages animals are first deeply sedated and then receive a local muscle relaxant.
3. The same procedure as described under 2 will be followed.
4. Recovery of the animals will be monitored and the veterinarian will be consulted in case of problems.
5. See 4.
6. Animals will receive tube feeding. This is applied during sedation.
7. Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached then the animal will be euthanised and a full necropsy will be performed to establish the cause of the disease and viral distribution over the respiratory tract.

#### **E. 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 F

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

Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms (7). When a clinical score of 35 is reached this indicates that the maximum duration of severity is reached then the animal will be humanely euthanised. Individual scores are added and the decision is based on the total daily score and veterinarian assessment of discomfort. Symptoms that lead to an immediate endpoint are: open mouth breathing or cyanosis, lethargy as defined by minimal response to human approach.

Indicate the likely incidence.

The percentage of animals reaching the end point will depend on the virus and the challenge dose used. Most RS viruses, including the macaque-adapted human-RSV strain, will only cause minimal disease and typically resolve within 14-21 days (1-4, 8-10). In the event another than the macaque-adapted human-RSV strain will be used or when challenge route and / or dose require adaptation, this will first be evaluated in a small number of animals. Weight will be recorded during the study, but a weight loss of 10% because of the infection has not been observed in any study described thus far and therefore cannot serve as a suitable end point.

#### **F. Classification of severity of procedures**

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

The total amount of discomfort is estimated as moderate. This is mainly caused by the surgical implantation and removal of the recording device and development of disease due to infection.

#### **G. 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	<p>The immune system is very complex and the in vivo interactions between virus and/or vaccine and host are not completely understood. At present there is no in vitro model available that can mimic the human immune system sufficiently to study the potential of a vaccine to induce protective immune responses. Due to the complex interaction of RSV with different tissues and the role of local immunity in eradication of the virus, the efficacy of an RSV vaccine to protect against infection can only be adequately established in an animal model.</p> <p>Several animal species have been used as a model for RSV infection (11). However, mice are only susceptible to high RSV challenge doses. Cotton rats and ferrets are also semi-permissive to RSV and recapitulate the natural course of infection. However, these models have the disadvantage that limited immunological tools are available, especially to study innate and cellular adaptive immune responses, which are especially important in the evaluation of vaccine strategies (12). NHP have an immune system that most closely resembles that of humans. Also the availability of many cross reactive reagents makes it possible to study in detail the contribution of the innate immune system and to analyse vaccine induced (local) immune responses and evaluate their role in control of infection. In addition, vaccine strategies that aim to trigger immune responses through targeting of specific cell surface molecules or innate immune receptors have either limited cross reactivity to other animal species or trigger different cell types or different responses because of differences in receptor expression pattern or cell signalling pathways. These aspects are essential for the evaluation of RSV vaccines. For these type of vaccines new vaccination strategies as well as vaccine modalities are used that aim for the induction of protective cellular immune responses or induction of neutralising antibody responses or non-neutralising antibody responses that become effective through interaction with innate immune cells. Here, the close homology between the immune system in NHP and humans is essential for proper induction and adequate analysis of these responses, allowing a better extrapolation to the human situation. Vaccines that will be tested in NHP have to be in the final stages of preclinical development and require this last validation step in order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species and that they are effective in an animal species that has an immune system closely related to humans.</p>
-------------	--

Reduction	Experience from previous experiments has shown that when the virus is inoculated by a standard route at a standard dose, four animals per test group are sufficient in order to determine whether a suitable infection model has been achieved and to perform a power calculation to determine the number of animals needed in a vaccine evaluation study. In case the criteria, as outlined under A are not met, a second experiment may be needed with an adapted dose. On the basis of the outcome of the first study the number of animals required in follow-up experiments can be calculated and less animals may be needed. Only the minimum number of animals needed, will be used.
Refinement	<p>The use of recording devices makes it possible to record physiological parameters, (temperature, heart- and respiratory-rate etc.) every 15 minutes. For influenza infection, we have designed a method that allows very precise calculation of fever induction caused by the infection (13). With this method we observed a significant fever reductions in influenza vaccinated animals (14). Such precise measurements are not possible with the traditional methods. RSV infection may, unlike influenza, not cause fever, but an increase in respiratory rate. As currently very limited information is available on these parameters in the macaque RSV infection model, we will evaluate their suitability as exploratory outcome measures. Placement and removal of the recording devices will require a small surgery, which will be done under anaesthesia. Subsequently animals will receive analgesics as long as required. Animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation.</p> <p>Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for enrichment in our institute that consists of playing material and methods to present food 10.2.g .</p> <p>During the study animals will be observed daily by qualified and competent animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool then a veterinarian will be informed and measures will be discussed with the investigator and implemented. Possible local reactions on the injection site of the vaccine will be recorded at multiple time points using a scoring system that includes redness, swelling and induration. In case substantial induration is seen, then the wound will be treated and analgesics will be applied. During the infection phase, animals will be observed twice daily and clinical symptoms will be scored using a well-established clinical scoring list adapted from Brining et al.(7) . On the basis of the scoring system a humane endpoint is defined. In addition, a sudden strong decrease in body temperature is taken as a humane endpoint. When this endpoint is reached the animal will be immediately euthanized and a full necropsy will be performed to determine the cause of clinical disease. All handlings will be performed under sedation. On every time point where a handling is performed the animal will be weighed and closely examined. During the first 2 days of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, since animals will be sedated daily during the first days after infection and the food intake during this period would otherwise be very limited.</p>

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

**H. Re-use**

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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



Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous RSV vaccine or RSV virus infection studies or that have pre-existing antibodies against RSV are not suitable. In view of the long life-span of the animals of this species re-use of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.

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.

### I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

[Not applicable]

### J. 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 K.

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.

## End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

In most studies the animals will be re-used after the virus is cleared (usually at day 21 after infection). However, in cases where possible adverse effects of the vaccine have to be studied animals are humanely euthanised and a full necropsy is performed.

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 > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Euthanasia is done by injection of an anaesthetic dose of ketamine followed by an overdose of barbiturate intravenously

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Not applicable



## References

1. De Swart RL, Kuiken T, Timmerman HH, van Amerongen G, Van Den Hoogen BG, Vos HW, et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) induces interleukin-13-associated hypersensitivity to subsequent RSV infection. *J Virol*. 2002;76(22):11561-9.
2. Grunwald T, Tenbusch M, Schulte R, Raue K, Wolf H, Hannaman D, et al. Novel vaccine regimen elicits strong airway immune responses and control of respiratory syncytial virus in nonhuman primates. *J Virol*. 2014;88:3997-4007.
3. de Waal L, Wyatt LS, Yuksel S, van Amerongen G, Moss B, Niesters HG, et al. Vaccination of infant macaques with a recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the respiratory syncytial virus F and G genes does not predispose for immunopathology. *Vaccine*. 2004;22(8):923-6.
4. Grandin C, Lucas-Hourani M, Clavel M, Taborik F, Vabret A, Tangy F, et al. Evidence for an intranasal immune response to human respiratory syncytial virus infection in cynomolgus macaques. *J Gen Virol*. 2015;96:782-92.
5. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:626-38.
6. Klein SL, Marriott I, Fish EN. Sex-based differences in immune function and responses to vaccination. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;109(1):9-15.
7. Brining DL, Mattoon JS, Kercher L, Lacasse RA, Safronetz D, Feldmann H, et al. Thoracic radiography as a refinement methodology for the study of H1N1 influenza in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Comp Med*. 2010;60:389-95.
8. Schmidt AC, McAuliffe JM, Murphy BR, Collins PL. Recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (B/HPIV3) expressing the respiratory syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and HPIV3. *J Virol*. 2001;75:4594-603.
9. McArthur-Vaughan K, Gershwin LJ. A rhesus monkey model of respiratory syncytial virus infection. *J Med Primatol*. 2002;31(2):61-73.
10. Vaughan K, Rhodes GH, Gershwin LJ. DNA immunization against respiratory syncytial virus (RSV) in infant rhesus monkeys. *Vaccine*. 2005;23(22):2928-42.
11. Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine*. 2017;35:469-80.
12. Albrecht RA, Liu WC, Sant AJ, Tompkins SM, Pekosz A, Meliopoulos V, et al. Moving Forward: Recent Developments for the Ferret Biomedical Research Model. *mBio*. 2018;9(4).
13. 10.2.e  
[REDACTED]
14. Impagliazzo A, Milder F, Kuipers H, Wagner MV, Zhu X, Hoffman RM, et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science*. 2015;349:1301-6.



# Advies aan CCD

Datum 24 maart 2021  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114508

Instelling: 10.2.g  
Onderzoeker: 10.2.e  
Project: Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques  
Aanvraagnummer: AVD202114508  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek

## 1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<b>Proces</b>	<p>Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC</p> <p>Aan de aanvrager is gevraagd over de NTS: U spreekt bij reasons for the planned fate of the animals dat dieren zullen worden geëuthanaseerd. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u euthanaseren veranderen in doden?</p> <p>Bij het tabblad expected harms is het aantal dieren dat u wilt gebruiken voor uw onderzoek verwarrend. Het lijkt nu alsof u 212 apen wilt gebruiken in plaats van 106 apen. Kunt u dit aanpassen zodat helder is dat het hier om 106 dieren gaat?</p> <p>Bij predicted harms is tweemaal dezelfde tekst te lezen. Kunt u de tekst eenmaal weergeven?</p> <p>Over bijlagen 3.4.3.1. en 3.4.3.2. van de dierproeven: U spreekt bij bijlagen 3.4.3.1. en 3.4.3.2. van de dierproeven bij verfijning over het vasten van de dieren. Dit is afwijkend van de richtlijn. Kunt u bij punt C invullen dat de dieren zullen worden gevast, en daarbij onderbouwen waarom dit nodig is?</p>
---------------	--

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques</b>				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	Rhesus monkey (Macaca mulatta) and cynomolgus macaque (Macaca fascicularis)	90	<b>Niet menselijke primaten</b>
<b>3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques</b>				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	Rhesus monkey (Macaca mulatta) and cynomolgus macaque (Macaca fascicularis)	16	<b>Niet menselijke primaten</b>

#### **Huisvesting en verzorging anders dan Bijlage III Richtlijn**

##### 3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques

Dieren zullen gevestigd worden voor sedatie. Aan de aanvrager is gevraagd dit onder punt C in te vullen.

##### 3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques

Dieren zullen gevestigd worden voor sedatie. Aan de aanvrager is gevraagd dit onder punt C in te vullen.


## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques

Rhesusapen (*Macaca mulatta*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat: Adult male and female animals can be used. Since there are immunological differences between males and females (6, 7), we prefer that for each individual experiment either all animals are male or all are female, in order to minimise the variation within the experimental test group, thereby increasing the probability of finding statistically significant differences between the experimental groups. This choice is also important with regard to the amount of blood needed to perform all assays. Male animals are usually larger than female animals and therefore more blood per time point can be drawn from males. In case assays need to be performed which consume large amounts of blood, male monkeys are preferred over females.

### 3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques

Rhesusapen (*Macaca mulatta*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Zie bijlage 3.4.3.1.

<b>Locatie uitvoering experimenten</b>	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
<b>Maatschappij</b>	11.1 

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Het DEC advies is volledig en kan als grondslag dienen voor het besluit.</p> <p>Citaat C9: Niet menselijke primaten: De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op de noodzaak niet-human primaten te gebruiken voor de evaluatie voor RSV vaccins. Het hierbij om nieuwe type vaccins waarvan nog niet eerder is aangetoond dat deze werkzaam kunnen zijn in primaten. Ook zal dit vaccins betreffen die alleen in apen getest kunnen worden omdat componenten van het vaccins zeer soort-specifiek zijn en niet kunnen worden geëvalueerd in andere proefdiersoorten. De DEC het eens met het gebruikt van apen voor dit onderzoek om deze redenen. Hergebruik: Hergebruik zal plaatsvinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven. De DEC is het eens met hergebruik van de dieren om deze redenen.</p> <p>Citaat C18: In onderhavige projectaanvraag worden dieren van één geslacht gebruikt. De immuunrespons van mannen en vrouwen is</p>
-------------------	---



verschillend. Door dieren van hetzelfde geslacht te nemen zal de variatie in de proefuitkomsten zo klein mogelijk zijn en dit zal de variatie in de uitkomst parameters verkleinen. Daardoor zullen minder proefdieren nodig zijn dan wanneer er met groepen van gemengde geslachten wordt gewerkt. Er is geen sprake van overschotten.

Citaat C19: De dieren zullen niet worden gedood aan het einde van de studie. De DEC is het eens met het eventuele hergebruik van de dieren mits er aan de kaders gesteld in de Wet op de Dierproeven is voldaan.

Citaat C20: De dieren zullen niet worden gedood aan het einde van de experimenten. De dieren kunnen eerder in onderzoek zijn gebruikt en kunnen na afloop voor hergebruik bestemd worden, dit alles met inachtneming van overwegingen rond dierenwelzijn.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat:

1. Rechtvaardigt het belang van het testen van vaccinkandidaten voor RSV op veiligheid, immunogeniciteit, en op bescherming in apen, het ongerief dat de dieren daardoor wordt aangedaan en is bij de uitvoering van deze experimenten aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren, andere onderzoek modellen of patiënten?

2. Alle 106 dieren (resus of java apen) zullen hoogstens matig ongerief ondergaan. Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en de autonomie in het geding, door de dieren handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Het betreft dieren waarbij de dieren geïmmuniseerd worden met een experimenteel RSV vaccin en vervolgens zullen worden besmet met RS virus. De welzijnsaantasting kan resulteren in ongerief na het plaatsen van een datalogger, het afnemen van bloed of slijmvlies monsters, en de klinische verschijnselen van de RSV infectie. Alle handelingen zullen onder sedatie of volledige narcose gebeuren. Het ongerief is dan veelal het bijkomen uit de verdoving/narcose. Ongerief en lijden zal zo veel mogelijk worden beperkt. Daarmee resulteert dit in maximaal matig ongerief voor de dieren.

De waarde voor de patiënten en de samenleving is het op termijn beschikbaar komen van een werkzaam vaccin voor RSV. Op dit moment is er geen werkzaam vaccin voor RSV beschikbaar. RSV veroorzaakt met name bij de risicogroepen (heel jonge kinderen, ouderen en mensen met een verzwakt immuunsysteem of onderliggende ziekten) een ernstige lage longinfectie en vaak zelfs mortaliteit. De behandeling van deze patiënten is een zware belasting van de zorg wereldwijd. Bovendien is er

voor de patiënten een risico op vervolgverschijnselen (ademhalingsproblemen, hyperreactiviteit van de luchtwegen en astma). Voor de producent van het vaccin is het op de markt brengen van een vaccin van economisch belang. Echter het belang voor de maatschappij overstijgt dit belang vele malen.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Er zijn vragen gesteld over de volgende onderwerpen:

- Fasering van de studie
- Experimentele ontwerp van de studie
- Het maximale aantal handelingen dat de dieren zal ondergaan
- Onderbouwing aantal dieren
- Keuze diersoort
- Primaire uitkomst parameter(s) en onderbouwing aantal dieren per groep
- Onderbouwing aantallen voor opzetten nieuw challenge model
- Onderbouwing vaccinatie routes
- Benoemen alle bronnen van ongerief
- Humane eindpunten
- Gebruik dataloggers
- Tekstuele aanpassingen aan NTS

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>	
	Er zijn DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag vanwege onafhankelijkheid of onpartijdigheid. Een van de leden is betrokken bij dit onderzoek. Dit lid heeft de vergadering verlaten tijdens de bespreking van het project.
Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld.	
U benoemt bij vraag C9 het hergebruik en het gebruik van niet humane primaten. U heeft hier echter niet het vasten van de dieren benoemd. U benoemt bij vraag C19 en C20 dat geen van de dieren zal worden gedood aan het einde van de studie. Een deel van de dieren waarbij mogelijke negatieve effecten van het virus moeten worden onderzocht zal echter wel gedood worden.	
De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.	

### 4 Inhoudelijke beoordeling

<b>Doelstelling</b> Doelstelling	<p>Citaat: The main objective of this proposal is to evaluate novel RSV vaccine candidates for safety, immunogenicity and protective efficacy following RS-virus infection in macaques. The capacity of new vaccine candidates to elicit durable neutralising immune responses will be evaluated under this project application. The ultimate objective of this project is to develop a RSV vaccine that induces durable protective responses against RSV infection. Vaccines that will be tested in NHP have to be in the final stages of preclinical development and require this final validation step in order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species and that they are effective in an animal species that has an immune system closely related to humans.</p> <p>The project has two objectives: 1. To evaluate novel RSV vaccine candidates for safety, immunogenicity and protective efficacy following RS-virus infection in macaques using the established RSV-macaque infection model and 2. Establishment of novel RSV infection models using a different challenge strain or route of infection.</p>
-------------------------------------	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat: Annual RSV epidemics cause considerable morbidity and mortality world-wide and especially affect more vulnerable groups like young children, the elderly and people with underlying diseases. In addition, pregnant women are also considered as RSV vaccine recipients, where trans-placental IgG can confer protection in neonates. The economic impact of RSV disease in adults is estimated to be greater than that of influenza in relation to numbers of days lost from work (10, 11). Currently no RSV vaccines are available and a RSV vaccine that induces durable protection against RSV will contribute to a reduction of RSV morbidity and mortality in (young) children and risk-groups. Thus, a vaccine that confers durable protection against RSV would have great societal impact. Both novel vaccines, for instance in the form of DNA, mRNA or viral vectors, as well as new vaccine delivery methods require evaluation in appropriate animal models so that the level as well as the mechanism of protection can be adequately established, before these new vaccines can be evaluated in clinical studies.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1
<b>Wetenschappelijke kwaliteit</b> Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat C7 uit het DEC advies: De kennis en kunde binnen de instelling en de directe betrokkenen bij de dierproeven met primaten zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de jarenlange ervaring van de instelling met het testen van vaccins in makaken.</p> <p>De DEC concludeert dat de aanvragers voor de uitvoering van de voorgestelde experimenten beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van de voorgestelde dierproeven.</p> <p>11.1</p>



### 3V's

Vervanging	<p><b>3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques:</b> Citaat: The immune system is very complex and the in vivo interactions between virus and/or vaccine and host are not completely understood. At present there is no in vitro model available that can mimic the human immune system sufficiently to study the potential of a vaccine to induce protective immune responses. Due to the complex interaction of RSV with different tissues and the role of local immunity in eradication of the virus, the efficacy of an RSV vaccine to protect against infection can only be adequately established in an animal model.</p> <p>Several animal species have been used as a model for RSV infection (9). However, mice are only susceptible to high RSV challenge doses. Cotton rats and ferrets are also semi-permissive to RSV and recapitulate the natural course of infection. However, these models have the disadvantage that limited immunological tools are available, especially to study innate and cellular adaptive immune responses, which are especially important in the evaluation of vaccine strategies (10). NHP have an immune system that most closely resembles that of humans. Also the availability of many cross reactive reagents makes it possible to study in detail the contribution of the innate immune system and to analyse vaccine induced (local) immune responses and evaluate their role in control of infection. In addition, vaccine strategies that aim to trigger immune responses through targeting of specific cell surface molecules or innate immune receptors have either limited cross reactivity to other animal species or trigger different cell types or different responses because of differences in receptor expression pattern or cell signalling pathways. These aspects are essential for the evaluation of RSV vaccines. For these type of vaccines new vaccination strategies as well as vaccine modalities are used that aim for the induction of protective cellular immune responses or induction of neutralising antibody responses or non-neutralising antibody responses that become effective through interaction with innate immune cells. Here, the close homology between the immune system in NHP and humans is essential for proper induction and adequate analysis of these responses, allowing a better extrapolation to the human situation. Vaccines that will be tested in NHP have to be in the final stages of preclinical development and require this last validation step in order to assure that there are no adverse effects that were missed in the preliminary studies in other species and that they are effective in an animal species that has an immune system closely related to humans.</p>
	<p><b>3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques:</b> Zie bijlage 3.4.3.1.</p>

Verminderen	
	<p><b>3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques:</b> Citaat: The number of animals needed per experiment will be based on statistical power calculation for achieving statistically significant induction of immune responses and a significant reduction in virus load in the respiratory tract between the vaccine groups and the challenge control group. Only the minimum number of animals needed will be used. Furthermore, we aim to evaluate multiple vaccine candidates in a single experiment, so that a single challenge control group can be used. This has to be weighed against the fact that in order to obtain significant differences in immune response between the vaccine groups, more animals per vaccine group may occasionally be required.</p>
	<p><b>3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques:</b> Citaat: Experience from previous experiments has shown that when the virus is inoculated by a standard route at a standard dose, four animals per test group are sufficient in order to determine whether a suitable infection model has been achieved and to perform a power calculation to determine the number of animals needed in a vaccine evaluation study. In case the criteria, as outlined under A are not met, a second experiment may be needed with an adapted dose. On the basis of the outcome of the first study the number of animals required in follow-up experiments can be calculated and less animals may be needed. Only the minimum number of animals needed, will be used.</p>
Verfijnen	

**3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques:** Citaat: The use of recording devices enables the monitoring of body temperature, heart- and breathing-rate every 15 minutes. We have designed a method that allows very precise calculation of fever induction caused by influenza infection (11). With this method we have observed a significant reduction in fever by influenza vaccine candidates (12). Such precise measurements are not possible with the traditional rectal temperature measurement. In addition, measurement of breathing rate may provide additional information on the RSV infection severity. Placement and removal of the temperature responders will require a small surgical procedure, which will be done under anaesthesia. Subsequently, animals will receive analgesics as long as required. Animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation. Animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation. Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for enrichment in our institute that consists of playing material and methods to present food

10.2.g  
During the study animals will be observed daily by qualified and competent animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool then a veterinarian will be informed and measures will be discussed with the investigator and implemented. Possible local reactions on the injection site of the vaccine will be recorded at multiple time points using a scoring system that includes redness, swelling and induration. In case substantial induration is seen, then the wound will be treated and analgesics will be applied. During the infection phase, animals will be observed twice daily and clinical symptoms will be scored using a well-established clinical scoring list adapted from Brining et al.(8). On the basis of the scoring system a humane endpoint is defined. In addition, a sudden strong decrease in body temperature is taken as a humane endpoint. When this endpoint is reached the animal will be immediately euthanized and a full necropsy will be performed to determine the cause of clinical disease. All handlings will be performed under sedation. On every time point where a handling is performed the animal will be weighed and closely examined. During the first 2 days of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, because animals have to fast the night before the sedation and since animals will be sedated daily during the first days after infection the food intake during this period would otherwise be very limited. The "Flora and Fauna wet" and "wet dieren" do not pose additional requirements that are needed for the type of studies proposed in this application.

**3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques:**

Citaat: The use of recording devices makes it possible to record physiological parameters, (temperature, heart- and respiratory-rate etc.) every 15 minutes. For influenza infection, we have designed a method that allows very precise calculation of fever induction caused by the infection (13). With this method we observed a significant fever reductions in influenza vaccinated animals (14). Such precise measurements are not possible with the traditional methods. RSV infection may, unlike influenza, not cause fever, but an increase in respiratory rate. As currently very limited information is available on these parameters in the macaque RSV infection model, we will evaluate their suitability as exploratory outcome measures. Placement and removal of the recording devices will require a small surgery, which will be done under anaesthesia. Subsequently animals will receive analgesics as long as required. Animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation. Animals will be socially housed with a socially compatible animal, whenever possible. There is an extensive program for enrichment in our institute that consists of playing material and methods to present food

10.2.g

During the study animals will be observed daily by qualified and competent animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool then a veterinarian will be informed and measures will be discussed with the investigator and implemented. Possible local reactions on the injection site of the vaccine will be recorded at multiple time points using a scoring system that includes redness, swelling and induration. In case substantial induration is seen, then the wound will be treated and analgesics will be applied. During the infection phase, animals will be observed twice daily and clinical symptoms will be scored using a well-established clinical scoring list adapted from Brining et al.(7). On the basis of the scoring system a humane endpoint is defined. In addition, a sudden strong decrease in body temperature is taken as a humane endpoint. When this endpoint is reached the animal will be immediately euthanized and a full necropsy will be performed to determine the cause of clinical disease. All handlings will be performed under sedation. On every time point where a handling is performed the animal will be weighed and closely examined. During the first 2 days of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, because animals have to fast the night before the sedation and since animals will be sedated daily during the first days after infection the food intake during this period would otherwise be very limited.



<b>Hergebruik</b>	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques: Citaat: Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments. Animals that have been involved in previous RSV vaccine or RSV virus infection studies or that have pre-existing antibodies against RSV are not suitable. In view of the long life-span of the animals of this species re-use of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.	
3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques: Zie bijlage 3.4.3.1.	

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques</b>	HEP: Citaat: The percentage of animals reaching the end point will depend on the virus and the challenge dose used. Most RS viruses, including the macaque-adapted human-RSV strain, will only cause minimal disease and typically resolve within 14-21 days (3). In the event another than the macaque-adapted human-RSV strain will be used or when challenge route and / or dose	Citaat: Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms (8). When a clinical score of 35 is reached this indicates that the maximum duration of severity is reached then the animal will be humanely euthanised. Individual scores are added and the decision is based on the total daily score and veterinarian assessment of discomfort. Symptoms that lead to an immediate endpoint are: open mouth breathing or cyanosis, lethargy as defined by minimal response to human approach.

	require adaptation, this will first be evaluated in a small number of animals (see appendix 2). Weight will be recorded during the study, but a weight loss of 10% because of the infection has not been observed in any study described thus far and therefore cannot serve as a suitable end point.	
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	
<b>3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques</b>	HEP: Zie bijlage 3.4.3.1.	Zie bijlage 3.4.3.1.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	

Opmerkingen over de dierproeven

<b>Naam proef</b>	<b>Opmerkingen</b>
3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques	Er zullen 90 dieren in totaal worden gebruikt. Er is geen specifieke voorkeur voor soort. Het gebruik van soort zal afhangen van beschikbaarheid en onderzoeksvraagstelling.
3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques	Er zullen 16 dieren in totaal worden gebruikt. Er is geen specifieke voorkeur voor soort. Het gebruik van soort zal afhangen van beschikbaarheid en onderzoeksvraagstelling.

## 5 Samenvatting

Het projectvoorstel bevat voldoende informatie over het belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's, het ongerief en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen. Het advies van de DEC kan hieraan ten

grondslag liggen.

Dit betreft een aanvraag waarbij niet humane primaten gebruikt zullen worden. De DEC vindt voldoende onderbouwd waarom deze diersoort gebruikt zal worden 11.1

Een klein deel van de dieren zal voor de proef gedood worden wanneer mogelijke negatieve effecten van het virus moeten worden onderzocht. Het grootste deel van dieren zal worden hergebruikt en niet worden gedood aan het einde van de proef. De DEC vindt dit voldoende onderbouwd 11.1

Beide geslachten zullen in dit onderzoek worden ingezet. De aanvrager geeft aan per individueel experiment gebruik te maken van 1 geslacht. Er is geen sprake van een fokoverschot. De DEC vindt dit voldoende onderbouwd 11.1

De dieren zullen de avond voordat ze gesedeerd worden moeten vasten. De aanvrager is gevraagd dit aan te vullen in de projectaanvraag. Het Secretariaat vindt 11.1 Hierbij heeft de aanvrager aangegeven dat het vasten niet genoemd heeft onder C, omdat dit een regulier onderdeel van de sedatieprocedure is. De tekst in de bijlages is aangepast naar: "During the first 2 days of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, since animals will be sedated daily during the first days after infection and the food intake during this period would otherwise be very limited. "

Het Secretariaat heeft vaker gesproken dat vasten als regulier onderdeel van de sedatie procedure niet per se een afwijking van huisvesting is. De aanvrager is wel gevraagd om het vasten bij onderdeel A van de bijlagen dierproeven bij the proposed animal procedures weer te geven.

#### **6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning**

Het Secretariaat 11.1

Het Secretariaat adviseert 11.1

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

### **7 Concept beschikking voor akkoord CCD**



10.2.e

**Van:** 10.2.e namens Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 29 maart 2021 11:18  
**Aan:** Info-zbo; 10.2.e  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

Beste meneer 10.2.e ,

Bedankt voor het verzenden van de nieuwe stukken. Helaas heb ik de stukken voordat ik ze kon opslaan ongeopend verwijderd. Kunt u me nogmaals dezelfde stukken sturen. Excuses voor dit extra werk.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

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

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 7890789

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

**Van:** 10.2.e Namens Info-zbo

**Verzonden:** woensdag 24 maart 2021 17:09

**Aan:** 10.2.e

**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

10

Beste meneer 10.2.e ,

Dank voor u snelle bericht. Wat betreft het vasten, kunt u dit wel onder A deel 2 proposed animal procedures van de bijlagen dierproeven benoemen? Zo wordt er een volledig beeld weergegeven van de handelingen die de dieren ondergaan.

Het nieuwe format is ook bij de CCD wenen. Ik zie het probleem dat bepaalde zaken niet verduidelijkt kunnen worden. Mijn voorstel zou zijn om bij beide soorten als aantal 53 neer te zetten. Dat klopt dan niet met de werkelijkheid, het is immers afhankelijk van beschikbaarheid en vraagstelling welke soort er gebruikt kan gaan worden. Toch zou ik hier de voorkeur aan geven dan wanneer het lijkt alsof er twee keer zoveel dieren zullen worden ingezet voor het onderzoek.

Ik zie de aangepaste documenten graag tegemoet.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

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

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 7890789

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

Van: 10.2.e  
Verzonden: woensdag 24 maart 2021 16:04  
Aan: info@zbo-ccd.nl; 10.2.e  
Onderwerp: RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

8

Geachte Mevrouw 10.2.e

Dank voor het toezenden van de CCD vragen.

Betreffende het aantal in de NTS:

In de projectaanvraag wordt toestemming gevraagd voor maximaal 106 dieren (resus of cynomolgus makaken). Beide soorten zijn geschikt voor de beschreven experimenten, maar in sommige gevallen (b.v. vergelijk eerdere studies of beschikbaarheid van reagentia) kan echter een specifieke soort nodig zijn. Het is daarom niet mogelijk om a priori de aantallen per soort vast te stellen. In het NTS Excel formulier is er geen mogelijkheid om dit aan te geven, dan wél dit te verduidelijken. Daarom is in eerste instantie 106 dieren bij beide soorten ingevoerd. Graag uw advies hoe de aantallen per soort duidelijker weer te geven.

Betreffende onduidelijkheden:

Vasten had hier niet genoemd moeten worden, omdat het een regulier onderdeel van de sedatieprocedure is. De tekst in de bijlages is aangepast naar: "During the first 2 days of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, since animals will be sedated daily during the first days after infection and the food intake during this period would otherwise be very limited."

Het is daarom dus ook niet nodig om dit onder punt C te verduidelijken

De aangepaste stukken zullen via NetFTP worden ingediend.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

10.2.e en 10.2.g

From: info@zbo-ccd.nl [mailto:info@zbo-ccd.nl]  
Sent: 24 March 2021 13:13  
To: 10.2.e en 10.2.g  
Cc: 10.2.e en 10.2.g  
Subject: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

7

Geachte Dr. 10.2.g,

Op 18-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114508. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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:

### **Niet technische samenvatting**

U spreekt bij reasons for the planned fate of the animals dat dieren zullen worden geëuthanaseerd. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u euthanaseren veranderen in doden? Bij het tabblad expected harms is het aantal dieren dat u wilt gebruiken voor uw onderzoek verwarrend. Het lijkt nu alsof u 212 apen wilt gebruiken in plaats van 106 apen. Kunt u dit aanpassen zodat helder is dat het hier om 106 dieren gaat? Bij predicted harms is tweemaal dezelfde tekst te lezen. Kunt u de tekst eenmaal weergeven?

### **Onduidelijkheden**

U spreekt bij bijlagen 3.4.3.1. en 3.4.3.2. van de dierproeven bij verfijning over het vasten van de dieren. Dit is afwijkend van de richtlijn. Kunt u bij punt C invullen dat de dieren zullen worden gevast, en daarbij onderbouwen waarom dit nodig is?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

### **Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

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

10.2.g

10.2.e

**Van:** 10.2.e namens Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 29 maart 2021 11:20  
**Aan:** Info-zbo; 10.2.e  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

Ik heb de documenten toch terug weten te halen. U hoeft ze niet nogmaals up te loaden gelukkig.

Groet 10.2.e

---

**Van:** 10.2.e Namens Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 29 maart 2021 11:18  
**Aan:** Info-zbo ; 10.2.e  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

16

Beste meneer 10.2.e ,

Bedankt voor het verzenden van de nieuwe stukken. Helaas heb ik de stukken voordat ik ze kon opslaan ongeopend verwijderd. Kunt u me nogmaals dezelfde stukken sturen. Excuses voor dit extra werk.

Met vriendelijke groet,  
 10.2.e

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

.....  
 Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
 .....

T: 0800 7890789  
 E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** 10.2.e Namens Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 24 maart 2021 17:09  
**Aan:** 10.2.e  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

10

Beste meneer 10.2.e ,

Dank voor u snelle bericht. Wat betreft het vasten, kunt u dit wel onder A deel 2 proposed animal procedures van de bijlagen dierproeven benoemen? Zo wordt er een volledig beeld weergegeven van de handelingen die de dieren ondergaan.

Het nieuwe format is ook bij de CCD wennen. Ik zie het probleem dat bepaalde zaken niet verduidelijkt kunnen worden. Mijn voorstel zou zijn om bij beide soorten als aantal 53 neer te zetten. Dat klopt dan niet met de werkelijkheid, het is immers afhankelijk van beschikbaarheid en vraagstelling welke soort er gebruikt kan gaan worden. Toch zou ik hier de voorkeur aan geven dan wanneer het lijkt alsof er twee keer zoveel dieren zullen worden ingezet voor het onderzoek.

Ik zie de aangepaste documenten graag tegemoet.

Met vriendelijke groet,  
 10.2.e



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

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 7890789  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** 10.2.e  
**Verzonden:** woensdag 24 maart 2021 16:04  
**Aan:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl); 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

8

Geachte Mevrouw 10.2.e

Dank voor het toezenden van de CCD vragen.

Betreffende het aantal in de NTS:

In de projectaanvraag wordt toestemming gevraagd voor maximaal 106 dieren (resus of cynomolgus makaken). Beide soorten zijn geschikt voor de beschreven experimenten, maar in sommige gevallen (b.v. vergelijk eerdere studies of beschikbaarheid van reagentia) kan echter een specifieke soort nodig zijn. Het is daarom niet mogelijk om a priori de aantallen per soort vast te stellen. In het NTS Excel formulier is er geen mogelijkheid om dit aan te geven, dan wel dit te verduidelijken. Daarom is in eerste instantie 106 dieren bij beide soorten ingevoerd. Graag uw advies hoe de aantallen per soort duidelijker weer te geven.

Betreffende onduidelijkheden:

Vasten had hier niet genoemd moeten worden, omdat het een regulier onderdeel van de sedatieprocedure is. De tekst in de bijlages is aangepast naar: "During the first 2 days of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, since animals will be sedated daily during the first days after infection and the food intake during this period would otherwise be very limited."  
Het is daarom dus ook niet nodig om dit onder punt C te verduidelijken

De aangepaste stukken zullen via NetFTP worden ingediend.

Met vriendelijke groet,  
10.2.e

10.2.e en 10.2.g

**From:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** 24 March 2021 13:13  
**To:** 10.2.e en 10.2.g  
**Cc:** 10.2.e en 10.2.g  
**Subject:** Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

Geachte 10.2.e

Op 18-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114508. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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:

#### Niet technische samenvatting

U spreekt bij reasons for the planned fate of the animals dat dieren zullen worden geëuthanaseerd. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u euthanaseren veranderen in doden? Bij het tabblad expected harms is het aantal dieren dat u wilt gebruiken voor uw onderzoek verwarrend. Het lijkt nu alsof u 212 apen wilt gebruiken in plaats van 106 apen. Kunt u dit aanpassen zodat helder is dat het hier om 106 dieren gaat? Bij predicted harms is tweemaal dezelfde tekst te lezen. Kunt u de tekst eenmaal weergeven?

#### Onduidelijkheden

U spreekt bij bijlagen 3.4.3.1. en 3.4.3.2. van de dierproeven bij verfijning over het vasten van de dieren. Dit is afwijkend van de richtlijn. Kunt u bij punt C invullen dat de dieren zullen worden gevestigd, en daarbij onderbouwen waarom dit nodig is?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

#### Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028

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

10.2.g

10.2.g

10.2.e

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** dinsdag 6 april 2021 12:01  
**Aan:** 10.2.e en 10.2.g  
**CC:** 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

Geachte 10.2.e

Op 18-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.e 202114508.

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 leges hebben ontvangen.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028  
E: info@zbo-ccd.nl



10.2.e

**Van:** 10.2.e en 10.2.g  
**Verzonden:** dinsdag 6 april 2021 15:46  
**Aan:** info@zbo-ccd.nl  
**CC:** 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** Re: Aanhouden AVD 10.2.e 202114508

Geachte mevrouw 10.2.e

Ik heb navraag gedaan bij de administratie. De factuur is inderdaad blijven liggen, deze wordt zsm betaald. Met mijn excuses.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

---

**Van:**  
**Beantwoorden - Aan:**  
**Datum:** dinsdag 6 april 2021 om 12:00  
**Aan:** 10.2.e  
**CC:**  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

18

Geachte 10.2.e

Op 18-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114508.

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 leges hebben ontvangen.

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

Met vriendelijke groet,  
 Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
 .....

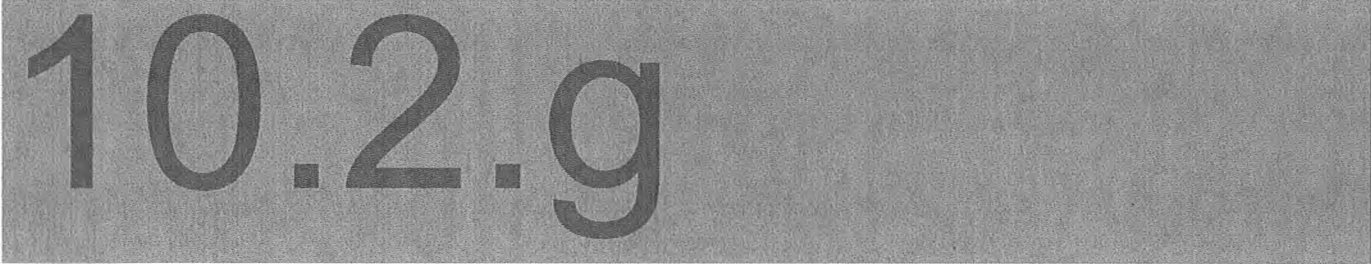
T: 0900 2800028  
 E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



10.2.g

10.2.g

Van: 10.2.e namens Info-zbo  
 Verzonden: dinsdag 6 april 2021 15:53  
 Aan: 10.2.e en 10.2.g  
 Onderwerp: RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

Beste 10.2.e

Dank voor je snelle antwoord. Zou je, wanneer de factuur is voldaan een screenshot van de overboeking naar me toe willen zenden? Dan hoef ik onze financiële afdeling niet af te wachten waardoor ik sneller de beschikking in het systeem op kan maken.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

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

Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

T: 0800 7890789

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

Van: 10.2.e en 10.2.g  
 Verzonden: dinsdag 6 april 2021 15:46  
 Aan: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
 CC: 10.2.e en 10.2.g  
 Onderwerp: Re: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

19

Geachte mevrouw 10.2.e,

Ik heb navraag gedaan bij de administratie. De factuur is inderdaad blijven liggen, deze wordt zsm betaald. Met mijn excuses.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Van: <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
 Beantwoorden - Aan: <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
 Datum: dinsdag 6 april 2021 om 12:00  
 Aan: 10.2.e 10.2.e en 10.2.g  
 CC: 10.2.e en 10.2.g  
 Onderwerp: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

18

Geachte Dr. 10.2.e

Op 18-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114508.

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 leges hebben ontvangen.

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

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028

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

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

10.2.g



10.2.e

**Van:** 10.2.e en 10.2.g  
**Verzonden:** donderdag 8 april 2021 16:04  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** Re: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508  
**Bijlagen:** Betaling Centrale Cie Dierproeven[1].pdf

21

**Categorieën:** 10.2.e

Beste 10.2.e

De factuur is vanmiddag voldaan. Bijgevoegd een screenshot van de overboeking.

Groet,

10.2.e

---

**Van:** 10.2.e namens Info-zbo  
**Datum:** dinsdag 6 april 2021 om 15:52  
**Aan:** 10.2.e  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

20

Beste 10.2.e

Dank voor je snelle antwoord. Zou je, wanneer de factuur is voldaan een screenshot van de overboeking naar me toe willen zenden? Dan hoef ik onze financiële afdeling niet af te wachten waardoor ik sneller de beschikking in het systeem op kan maken.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

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

.....  
Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
.....

T: 0800 7890789  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** 10.2.e en 10.2.g  
**Verzonden:** dinsdag 6 april 2021 15:46  
**Aan:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**CC:** 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** Re: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

19

Geachte mevrouw 10.2.e

Ik heb navraag gedaan bij de administratie. De factuur is inderdaad blijven liggen, deze wordt zsm betaald. Met mijn excuses.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

**Van:** <info@zbo-ccd.nl>

**Beantwoorden - Aan:** <info@zbo-ccd.nl>

**Datum:** dinsdag 6 april 2021 om 12:00

**Aan:** 10.2.e 10.2.e en 10.2.g

**CC:** 10.2.e en 10.2.g

**Onderwerp:** Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

18

Geachte 10.2.e

Op 18-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114508.

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 leges hebben ontvangen.

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

Met vriendelijke groet,

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0900 2800028

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

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

10.2.g

# 10.2.g

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

# 10.2.g

10.2.e

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** maandag 12 april 2021 10:23  
**Aan:** Braunstahl, drs. F. (Ferry) 10.2.e  
**CC:** 10.2.e  
**Onderwerp:** Ondertekening AVD 10.2.g 202114508

Aanvraag AVD 10.2.g 202114508 staat klaar ter ondertekening.  
Het betreft een nieuwe aanvraag.

10.2.e

10.2.e

**Van:** 10.2.e namens Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 12 april 2021 10:24  
**Aan:** 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

Beste 10.2.e

Dank voor je bericht en de screenshot. De beschikking komt vandaag of morgen jullie kant op.

Groeten 10.2.e

---

**Van:** 10.2.e en 10.2.g  
**Verzonden:** donderdag 8 april 2021 16:04  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** Re: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

21

Beste 10.2.e

De factuur is vanmiddag voldaan. Bijgevoegd een screenshot van de overboeking.

Groet,

10.2.e

---

**Van:** 10.2.e 10.2.e @rvo.nl> namens Info-zbo  
 <info@zbo-ccd.nl>  
**Datum:** dinsdag 6 april 2021 om 15:52  
**Aan:** 10.2.e 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

20

Beste Jan,

Dank voor je snelle antwoord. Zou je, wanneer de factuur is voldaan een screenshot van de overboeking naar me toe willen zenden? Dan hoef ik onze financiële afdeling niet af te wachten waardoor ik sneller de beschikking in het systeem op kan maken.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

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

.....  
 Prinses Beatrixlaan 2 | 2595 AL | Den Haag  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
 T: 0800 7890789

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

---

**Van:** 10.2.e en 10.2.g 10.2.e en 10.2.g  
**Verzonden:** dinsdag 6 april 2021 15:46  
**Aan:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



CC: 10.2.e en 10.2.g

Onderwerp: Re: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

Geachte mevrouw 10.2.e

Ik heb navraag gedaan bij de administratie. De factuur is inderdaad blijven liggen, deze wordt zsm betaald. Met mijn excuses.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

---

Van: <info@zbo-ccd.nl>

Beantwoorden - Aan: <info@zbo-ccd.nl>

Datum: dinsdag 6 april 2021 om 12:00

Aan: 10.2.e 10.2.e en 10.2.g

CC: 10.2.e en 10.2.g

Onderwerp: Aanhouden AVD 10.2.g 202114508

Geachte 10.2.e

Op 18-02-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114508.

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 leges hebben ontvangen.

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

Met vriendelijke groet,

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
 .....

T: 0900 2800028

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

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

## 10.2.g

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

## 10.2.g

10.2.e

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** maandag 12 april 2021 21:31  
**Aan:** Secretariaat OBDA  
**CC:** 10.2.e  
**Onderwerp:** Ondertekening AVD<sup>10.2.g</sup>202114508 akkoord

Beste Marjolein,

De beschikking van aanvraag AVD<sup>10.2.g</sup>202114508 is ondertekend.  
Het betreft een nieuwe aanvraag.

Opmerkingen m.b.t. de beschikking:

@secretariaat: graag 10.2.e in de adressering en de aanhef veranderen in 10.2.e. Willen jullie dit ook gelijk in het adressenbestand aanpassen? THNX!

Ferry Braunstahl



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

10.2.g

10.2.e

10.2.g

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD 10.2.g 202114508  
**Bijlagen**  
3

**Datum** 12 april 2021  
**Betreft** Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Geachte** 10.2.e

Op 18 februari 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114508. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 1 augustus 2021 tot en met 31 juli 2026.

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

#### **Beoordeling achteraf**

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

## **Procedure**

**Datum:**  
12 april 2021  
**Aanvraagnummer:**  
AVD 10.2.g 202114508

### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie 10.2.g (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 15 maart 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 24 maart 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het aanpassen van de Niet Technische Samenvatting en het invullen en onderbouwen van het vasten van de dieren in de bijlagen dierproeven. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

## **Overwegingen**

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

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

### *Beoordeling achteraf*

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d van de wet. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2027 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

## **Bezwaar**

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

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC Den Haag.

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

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



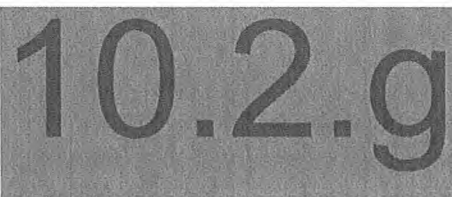
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

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

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



drs. F. Braunstahl  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

**Datum:**

12 april 2021

**Aanvraagnummer:**

AVD10.2.g 202114508



# Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

10.2.g

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2021 tot en met 31 juli 2026, voor het project "Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques" met aanvraagnummer AVD10.2.g 202114508, na advies van dierexperimentencommissie 10.2.g De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.e

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 18 februari 2021
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 15 maart 2021;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques, zoals ontvangen op 24 maart 2021;
    - 3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques, zoals ontvangen op 24 maart 2021;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 24 maart 2021;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 15 maart 2021
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 24 maart 2021.

Aanvraagnummer: AVD10.2.g202114508

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief	Overige opmerkingen
<b>3.4.3.1. RSV vaccine evaluation in macaques</b>				Er zullen 90 dieren in totaal worden gebruikt. Er is geen specifieke voorkeur voor soort. Het gebruik van soort zal afhangen van beschikbaarheid en onderzoeksvraagstelling.
	Rhesusapen (Macaca mulatta) / Rhesus monkey (Macaca mulatta) and cynomolgus macaque (Macaca fascicularis)	90	100,0% Matig	
<b>3.4.3.2. Establishment of a new RSV infection model in macaques</b>				Er zullen 16 dieren in totaal worden gebruikt. Er is geen specifieke voorkeur voor soort. Het gebruik van soort zal afhangen van beschikbaarheid en onderzoeksvraagstelling.
	Rhesusapen (Macaca mulatta) / Rhesus monkey (Macaca mulatta) and cynomolgus macaque (Macaca fascicularis)	16	100,0% Matig	

#### Voorwaarden

##### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2027 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

**Aanvraagnummer:** AVD10.2.g 202114508

**Geldende voorschriften**

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

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



**Aanvraagnummer:**

AVD 10.2.0 202114508

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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



**Aanvraagnummer:**

AVD10.2.g 202114508

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

**Einde van een dierproef**

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

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

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

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

**Levensloofdossier**

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

**Niet-menselijke primaten**

De Minister heeft een ontheffing verleend volgens artikel 10e, zevende lid van de wet, die het gebruik van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

**Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, eerste lid onder d en derde lid van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die

**Aanvraagnummer:**  
AVD 10.2.g 202114508

leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld.

10.2.e

**Van:** 10.2.e  
**Verzonden:** dinsdag 13 april 2021 11:47  
**Aan:** 10.2.e en 10.2.g  
**CC:** 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** Beschikking AVD 10.2.g 202114508  
**Bijlagen:** Beschikking AVD 10.2.g 202114508.pdf; AVD 10.2.g 202114508 Advies (15-03-2021).pdf

Geachte 10.2.g

In de bijlage treft u het besluit op uw digitaal ontvangen aanvraag voor een projectvergunning.

Gedurende de behandeling van uw aanvraag hebben wij hierover met u per e-mail gecorrespondeerd. Op uw verzoek hebben wij de verantwoordelijk onderzoeker uit uw organisatie in de CC gezet.

Met vriendelijke groet,  
10.2.e

**Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)**  
**Nationaal Comité advies dierproevenbeleid [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)**

.....  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
T: 0800-7890789  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

10.2.e

**Van:** 10.2.e  
**Verzonden:** woensdag 14 april 2021 09:50  
**Aan:** 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** RE: Beschikking AVD 10.2.g 202114508  
**Bijlagen:** AVD 10.2.g 202114508 Advies (15-03-2021).pdf

Beste 10.2.e

Excuses voor het ongemak. Hier heeft u de onbeveiligde versie.

Heeft u nog vragen dan hoor ik dat graag,

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Aanwezig ma t/m do  
Medewerker OBDA

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)  
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag

T: 0800-7890789  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

---

**Van:** 10.2.e en 10.2.g  
**Verzonden:** dinsdag 13 april 2021 18:13  
**Aan:** 10.2.e  
**Onderwerp:** Re: Beschikking AVD 10.2.g 202114508

Beste mevrouw 10.2.e

Hartelijk dank voor het toesturen van de beschikking en het bijbehorende advies. Ik kan het advies niet openen omdat het beveiligd is. Kunt u een exemplaar hiervan sturen dat ik wel kan openen.

Alvast mijn dank

Vriendelijke groet,

10.2.e

10.2.e en 10.2.g

Van: 10.2.e [redacted]@rvo.nl>

Datum: dinsdag 13 april 2021 om 11:46

Aan: 10.2.e [redacted] 10.2.e en 10.2.g [redacted]

CC: 10.2.e en 10.2.g [redacted]

Onderwerp: Beschikking AVD10.2.g202114508

26

Geachte 10.2.g [redacted]

In de bijlage treft u het besluit op uw digitaal ontvangen aanvraag voor een projectvergunning.

Gedurende de behandeling van uw aanvraag hebben wij hierover met u per e-mail gecorrespondeerd. Op uw verzoek hebben wij de verantwoordelijk onderzoeker uit uw organisatie in de CC gezet.

Met vriendelijke groet,

10.2.e [redacted]

**Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)**  
**Nationaal Comité advies dierproevenbeleid [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)**

.....  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
T: 0800-7890789  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

10.2.g



10.2.e

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** dinsdag 18 mei 2021 10:59  
**Aan:** 10.2.g  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 10.2.g 202114508

Geachte 10.2.g

Op 18-02-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Evaluation of novel RSV vaccine candidates for immunogenicity and capacity to protect against RSV infection in macaques' met aanvraagnummer AVD 10.2.g 202114508.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op het aanpassen van de Niet Technische Samenvatting en het invullen en onderbouwen van het vasten van de dieren in de bijlagen dierproeven.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 13-4-2021.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld.

U benoemt bij vraag C9 het hergebruik en het gebruik van niet humane primaten. U heeft hier echter niet het vasten van de dieren benoemd. U benoemt bij vraag C19 en C20 dat geen van de dieren zal worden gedood aan het einde van de studie. Een deel van de dieren waarbij mogelijke negatieve effecten van het virus moeten worden onderzocht zal echter wel gedood worden. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

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

Met vriendelijke groet,  
 Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
 Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag  
 .....

T: 0900 2800028  
 E: info@zbo-ccd.nl

## NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Onderzoek naar de beschermende werking van vaccins tegen Respiratoir Syncytieel Virus in apen
NTS-identificatiecode	NTS-NL-996069 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Respiratory syncytial virus Vaccine Vaccine-efficacy Non-human primates
Doel(en) van het project	Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Besmettelijke ziekten van de mens

29

## DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Respiratoir Syncytieel Virus (RSV) is een van de belangrijkste veroorzakers van luchtweginfecties en veroorzaakt wereldwijd tot 200.000 sterftegevallen in kinderen onder de 5 jaar. Het komt in Nederland vooral in de winter frequent voor en bijna alle kinderen onder de twee jaar raken geïnfecteerd met het virus. Jaarlijks worden er in Nederland 2000 RSV-geïnfecteerde kinderen in het ziekenhuis opgenomen waarvan uiteindelijk 10% op de intensive care terecht komt. Voor ouderen in verzorgings- en verpleeghuizen is een RSV-infectie wereldwijd de tweede meest voorkomende veroorzaker van uitbraken van infectieziekten. In Nederland wordt geschat dat in sommige seizoenen zelfs meer oudere mensen aan RSV overlijden dan aan griep (influenza) (Bron RIVM). Op dit moment is er geen RSV-vaccin beschikbaar en het is daarom nodig om vaccins te maken die risicogroepen kunnen beschermen tegen RSV-infecties. Omdat hiervoor geheel nieuwe methodes nodig zijn, waarvan nog niet goed voorspeld kan worden hoe goed ze zullen werken, is uitgebreid testen zowel in het laboratorium als in proefdieren noodzakelijk, voordat deze vaccins bij de mens getest kunnen worden. Het doel van dit project is om deze nieuwe RSV-vaccins in apen te testen om vast te stellen of ze geen onverwachte bijwerkingen geven, een goede afweerreactie opwekken en of het vaccin bescherming biedt tegen RSV-infectie. In sommige gevallen kan het nodig zijn een ander virus (dan het standaard makaak-aangepaste RS virus) of een andere infectieroute (dan standaard) te gebruiken om de effectiviteit van een vaccin te bepalen, hiervoor wordt dan eerst een experiment uitgevoerd om de dosis vast te stellen waarbij alle dieren geïnfecteerd raken.</p>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).</p>	<p>Het uiteindelijke doel van de experimenten die in dit project worden uitgevoerd is om een vaccin te verkrijgen dat langdurige bescherming tegen RSV-infectie geeft. Een dergelijk vaccin kan veel levens redden en biedt kwetsbare groepen in de samenleving betere bescherming.</p>

**VOORSPELDE SCHADE**

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Sedatie, bij iedere handeling (gedurende 15-60 minuten, maximaal 24x)                  Implantatie / verwijderen recorder, chirurgisch 1x in 1 x uit (± 60 minuten)                  Vaccinatie (tot 4x, 30 minuten)                  Bloedafnames (tot 4x na iedere vaccinatie, 30 minuten, maximaal 16 x)                  Bronchoalveolaire lavage (tot 4x na iedere vaccinatie, 60 minuten, maximaal 16x)                  Virus infectie (maximaal 2x, 30 minuten)                  Bepaling virus load (neus, keel en kleine BAL tot 6x na infectie, 60 minuten, maximaal 12x)                  CT-scan (tot 4x na infectie, 30 minuten, maximaal 8x)</p>																						
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Ongerief als gevolg van implantatie / verwijderen recorder                  Ongerief als gevolg van bloedafnames                  Ongerief als gevolg van bronchoalveolaire lavages                  Ongerief als gevolg van virusinfectie                  Ongerief als gevolg van CT-scans                  Ongerief als gevolg van bepaling virus load (kleine BAL, neus / keel swabs)                  Stress als gevolg van sedatie en herstel daarvan                  Verminderde eetlust na (herhaalde) sedaties</p>																						
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Rhesusapen (Macaca mulatta)</td> <td>66</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>66</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Java-apen (Macaca fascicularis)</td> <td>40</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>40</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Rhesusapen (Macaca mulatta)	66	0	0	66	0	Java-apen (Macaca fascicularis)	40	0	0	40	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad																			
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig																		
Rhesusapen (Macaca mulatta)	66	0	0	66	0																		
Java-apen (Macaca fascicularis)	40	0	0	40	0																		
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Rhesusapen (Macaca mulatta)</td> <td>54</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Java-apen (Macaca fascicularis)</td> <td>32</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd	Rhesusapen (Macaca mulatta)	54	0	0	Java-apen (Macaca fascicularis)	32	0	0							
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																						
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd																				
Rhesusapen (Macaca mulatta)	54	0	0																				
Java-apen (Macaca fascicularis)	32	0	0																				
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Het merendeel van de dieren kan worden hergebruikt, in sommige gevallen kan het echter nodig zijn om pathologie en of aanwezigheid van specifieke immuuncellen in de luchtwegen aan te tonen. In die gevallen zullen de dieren op humane wijze gedood worden (maximaal 20 dieren per soort). In andere gevallen kan het zo zijn dat de wet en regelgeving voor genetisch-gemodificeerde organismen (b.v. non replicerende humane Adenovirussen als vaccinvector) hergebruik van dieren belemmert, ook in die gevallen zullen de dieren geëuthanaseerd worden(maximaal 20 dieren).</p>																						

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p><b>1. Vervanging</b> Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Het is nog niet mogelijk om de beschermende werking van vaccins zonder gebruik van proefdieren te bepalen. Het afweersysteem is dermate ingewikkeld dat dit nog niet volledig in het laboratorium kan worden nagebootst. Ook de beschermende werking van het vaccin tegen virusinfectie is complex en wordt bepaald door hoe de diverse onderdelen van het afweersysteem op lokaal niveau in de long de juiste type cellen kunnen mobiliseren en activeren en het individu kunnen beschermen tegen infectie met het RS-virus of beschermen tegen ziekteverschijnselen.</p>
<p><b>2. Vermindering</b> Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Voordat een RSV-vaccin in apen wordt getest, is het al uitgebreid getest in het laboratorium en in andere diersoorten, bijvoorbeeld in katoenratten. Uit dit eerdere onderzoek moet zijn gebleken dat het vaccin veilig is en dat het vaccin voldoende werkzaam is om een afweerreactie op te roepen na toediening. Hierna worden alleen de beste vaccins in apen getest. Het aantal benodigde dieren wordt per experiment bepaald aan de hand van statistische analyses. Dit aantal zal afhangen van de eigenschappen van het vaccin en van de te gebruiken controlegroep. Waar mogelijk zullen meerdere vaccins tegelijk getest worden, waardoor maar één controlegroep nodig is. Het aantal dieren in de controlegroep zal zoveel mogelijk worden beperkt door gegevens te gebruiken van dieren die reeds eerder geïnfecteerd zijn bij het opzetten van de virusinfectiemodellen.</p>
<p><b>3. Verfijning</b> Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>Onderzoek naar de werkzaamheid van RSV-vaccins kan in diverse diersoorten worden uitgevoerd. Alleen in de laatste fase van de vaccinontwikkeling is testen in apen nodig, omdat deze dieren wat betreft de anatomie van de luchtwegen, het afweersysteem en vatbaarheid voor RSV het meest op de mens lijken. De gelijkenis van immuunsysteem maakt dat de afweerreactie tot in detail kan worden onderzocht. Andere proefdieren, zoals katoenratten of fretten zijn in deze fase van het onderzoek niet geschikt, omdat deze wat betreft hun afweersysteem op diverse punten afwijken van de mens.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>Zowel resus als java-makaken (juveniel en volwassen) kunnen met RS virus geïnfecteerd worden, waarbij leeftijd geen rol speelt bij de gevoeligheid voor infectie. Bij volwassen dieren kunnen grotere hoeveelheden bloed worden verzameld dan bij juveniele dieren, daarom zullen volwassen resus of java makaken gebruikt worden.</p>



**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	31-07-2027
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	ja
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	