

Inventaris Wob-verzoek W17-05										
nr.	document NTS nr 2015283	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x	x		x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x		x		
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x		x		
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x	x		x		
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x	x		x		
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5				x	x		x		
9	Bijlage beschrijving dierproeven 6				x	x		x		
10	Bijlage flowchart			x						
11	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
12	Verzoek advies aan DEC				x	x	x	x		
13	DEC advies				x		x	x		
14	adviesnota CCD		x							x
15	Beschikking				x	x	x	x		

24 MAART 2016



### Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

#### 1 Gegevens aanvrager

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

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

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

Naam instelling of organisatie BioXpert B.V.  
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted]  
KvK-nummer 54838134  
Straat en huisnummer Nistelrooise Baan 3  
Postbus  
Postcode en plaats 5374RE Schaijk  
IBAN NL72RABO0183605888  
Tenaamstelling van het rekeningnummer BioXpert B.V.

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

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

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

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

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

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 15 - 3 - 2016
- Einddatum 14 - 3 - 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC [REDACTED]
- Postadres [REDACTED]
- E-mailadres [REDACTED]

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1870 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	[REDACTED]
Functie	Vergunninghouder
Plaats	Schaijk
Datum	10 - 21 - 2016
Handtekening	[REDACTED]



24 MAART 2016

**BioXpert B.V.**

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

[info@bioxpert.nl](mailto:info@bioxpert.nl)

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

Aan: Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Datum: 23 maart 2016

Betreft: Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD905002015283

Geachte heer / mevrouw,

Bijgaand namens [REDACTED] de getekende aanvraag Projectvergunning Dierproeven AVD905002015283 met als titel: *Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen.*

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]



## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u 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.

### 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 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

In het kader van de ontwikkeling van vaccins en antivirale middelen (gezamenlijk: antivirale preparaten)

tegen (uitbraken van) coronavirusinfecties biedt de aanvrager van dit projectvoorstel verschillende preklinische modellen aan om deze antivirale preparaten uit te testen. Deze modellen kunnen worden ingezet om preparaten verschaft door derden/opdrachtgevers (in het algemeen farmaceutische bedrijven) uit te testen. Deze bedrijven maken gebruik van de expertise van de aanvrager voor het bepalen van het relevante preklinische model om een specifiek preparaat uit te testen. De resultaten verkregen in de studies beschreven in dit projectvoorstel kunnen door de opdrachtgevers worden gebruikt om de geteste antivirale preparaten verder te ontwikkelen voor toepassing in de mens teneinde (de gevolgen van) coronavirusinfecties te bestrijden.

### **Coronavirussen, achtergrond en uitbraken.**

Leden van de virusfamilie *Coronaviridae* infecteren een breed scala aan diersoorten waarbij voor de meeste virussen geldt dat infectie, replicatie en verspreiding voorbehouden zijn aan een specifieke gastheersoort ( ). Humane coronavirussen veroorzaken in de mens doorgaans zelflimiterende infecties van de luchtwegen. Desalniettemin hebben zich in de afgelopen 12 jaar twee coronavirus (CoV)-uitbraken voorgedaan met grote gevolgen voor maatschappij, economie en volksgezondheid van de getroffen gebieden: SARS-CoV in China in 2002-2003 en MERS-CoV in het Midden-Oosten (voornamelijk Saoedi Arabië) vanaf 2012. In beide uitbraken was er sprake van dierlijke virussen die de soortbarrière overstaken (zoönotische transmissie). In het eerste geval werd vóór de identificatie van de veroorzaker de ziekte door de WHO gedefinieerd als Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). Geïnfecteerde patiënten vertoonden ernstige respiratoire symptomen die in een significant deel van hen leidde tot de dood. Door een sterk internationaal klinisch wetenschappelijk samenwerkingsoffensief werd in korte tijd de identificatie van het etiologische agens uitgevoerd, die de naam SARS-CoV kreeg ( ). Epidemiologisch onderzoek toonde aan dat in het geval van SARS-CoV nauw verwante virussen aangetroffen werden in wilde dieren die op markten verhandeld werden. Deze herhaalde blootstelling van de mens heeft aan de zoönotische transmissie van het virus bijgedragen, waarbij de verhandelde dieren waarschijnlijk eerder doorgeefluik van het virus vormden dan de bron van het virus. De meest waarschijnlijke bron voor SARS-CoV is de vleermuis, waarvoor recent een virus geïdentificeerd is waarvan het genetisch materiaal voor 95% overeenkomt met de humane isolaten en dat gebruik maakt van dezelfde receptor ( ). Voor de verspreiding van het SARS-CoV bleken zogenaamde "super spreading" events kenmerkend te zijn: geïnfecteerde individuen die het virus in korte tijd overdroegen naar tientallen mensen, veelal familieleden en ziekenhuispersoneel. Mens-op-mens transmissie bleek een feit. Reizende geïnfecteerde individuen vormden vervolgens de bron voor uitbraken op meerdere continenten binnen een tijdsbestek van een paar maanden. SARS-CoV verspreidde zich aldus via vliegtuigroutes waarbij uiteindelijk 8000 mensen geïnfecteerd werden in 25 landen (WHO). Met 800 doden bedroeg de mortaliteit 10%. In afwezigheid van specifieke reagentia tegen dit nieuwe virus was de belangrijkste wijze waarop de globale epidemie uiteindelijk kon worden ingedamd dan ook door strikte toepassing van maatregelen die erop gericht waren verspreiding te stoppen: strikte toepassing van hygiënemaatregelen, quarantaine van patiënten, uitgebreide tracering van personen waarmee geïnfecteerde in contact waren geweest, etc. Hierdoor kon de WHO in juli 2003 mededelen dat mens-op-mens overdracht van het virus en daarmee de verspreiding tot een halt was gebracht.

Tien jaar later werd opnieuw een zeer pathogeen coronavirus bij de mens geïdentificeerd (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV), dat sterk lijkt op het SARS-coronavirus. Het virus werd voor het eerst in mensen geïdentificeerd in 2012 in patiënten met een acute longontsteking. Vervolgens werd het virus aangetoond in dromedarissen, van waaruit zoönotische transmissie de infectie bij de mens kan veroorzaken. In dromedarissen verloopt de infectie grotendeels asymptomatisch. Net als bij SARS greep de epidemie om zich heen als gevolg van mens-op-mens transmissie, met name in ziekenhuizen, en liet vanaf 2014 een duidelijke toename zien ( ). Het scenario dat zich bij de SARS epidemie van een decennium eerder had voorgedaan, leek zich ook voor MERS te gaan ontrollen. Het virus veroorzaakt een ernstige lagere luchtweginfectie. Er zijn op dit moment 1542 globale gevallen geregistreerd bij de WHO (status september 2015), met een mortaliteit van >40% (544 doden). SARS manifesteerde zich indertijd als een infectieziekte in verder gezonde individuen. Bij MERS is in de meeste gevallen sprake van comorbiditeit en doet de aandoening zich vooral voor bij ouderen. In tegenstelling tot de SARS uitbraak in 2003 is de

MERS epidemie na drie jaar nog altijd niet onder controle.

### **Bestrijding en ontwikkeling van antivirale middelen en vaccins**

In afwezigheid van effectieve antivirale middelen bestond de bestrijding van de SARS uitbraak vooral uit het gebruik van breed spectrum antibiotica om secundaire bacteriële infecties te voorkomen. Ze vormden hiermee een aanvulling op de ondersteunende behandelingsprotocollen ( ). Omdat de uitbraak door strikt klinisch management binnen een aantal maanden succesvol onder controle gebracht werd verdween de noodzaak om de ontwikkeling van specifieke antivirale middelen en behandelmethoden te onderzoeken en uit te voeren zowel bij wetenschappers als de beleidsmakers. Dit is vervolgens in het licht van de MERS-CoV uitbraak dan ook gezien als een gemiste kans ( ). Er werden aldus beperkt initiatieven ontplooid om onderzoek naar therapeutische en profylactische middelen door te zetten. Het gevolg hiervan was dat er op het moment van de MERS-uitbraak geen specifieke middelen voorhanden waren. Men moest terugvallen op de behandelmethoden die indertijd ook als eerste defensiemiddel werden ingezet en waarvan de daadwerkelijke effectiviteit in onderzoeken achteraf discutabel bleek. In recent onderzoek is aangetoond dat Type I interferon en ribavirine (een breed spectrum antiviraal middel) ziekteverschijnselen in MERS-CoV geïnfecteerde makaken kunnen reduceren ( ). Van een aantal zogenaamde small compounds is in vitro aangetoond dat ze MERS-CoV replicatie kunnen remmen (o.a. ). Dit zijn de eerste aanknopingspunten om gerichte ontwikkeling van coronavirus specifieke antivirale middelen weer op te pakken en door te zetten. Voor zowel SARS-CoV als MERS-CoV wordt een tweetal virale proteases als belangrijkste targets voor de ontwikkeling van antivirale middelen gezien. Echter, tot dusver is nog geen enkel van deze op basis van in vitro modellen ontwikkelde compounds door een preklinisch ontwikkelingsprogramma gekomen (Hilgenfeld, 2014, FEBS J). Vaccinontwikkeling tegen MERS-CoV is gestart waarbij de meest gekozen benadering is om antilichamen op te wekken tegen het spike (S) eiwit. Dit eiwit zorgt door middel van interactie met receptormolecuul DPP4 voor infectie ( ). Aangetoond is dat virus-neutraliserende antistoffen betrokken zijn bij de reductie van longpathologie en bescherming tegen MERS-CoV infectie ( ). Deze recente resultaten laten zien dat de ontwikkeling van een effectief MERS-CoV vaccin haalbaar lijkt. Virus neutraliserende monoklonale antistoffen zouden ontwikkeld kunnen worden voor toekomstig gebruik als een profylactisch middel om bijvoorbeeld ziekenhuispersoneel of familieleden van patiënten preventief te behandelen ( ). Er wordt momenteel dus op meerdere fronten gewerkt aan de ontwikkeling van zowel preventieve als therapeutische middelen tegen MERS-CoV infectie en ziekte. Op dit moment is er nog geen specifiek antiviraal interventiemiddel tegen SARS- of MERS-CoV geregistreerd voor gebruik. Zowel aan vaccins als aan antilichaampreparaten of antivirale middelen die, al dan niet gecombineerd, voor preventie dan wel behandeling ingezet kunnen worden is dus een grote behoefte.

### **Preklinische modellen**

Een grote belemmering voor de ontwikkeling van de gewenste interventiestrategieën is de beperkte beschikbaarheid van (kleine) diermodellen voor infectie. Voor zowel SARS- als MERS-CoV zijn modellen ontwikkeld in non-humane primaten (NHP). Deze modellen zijn op ethische en praktische gronden voor de studies in dit projectvoorstel niet geschikt. Voor SARS-CoV infectie is een aantal diermodellen beschikbaar. Fretten, katten ( ), hamsters ( ) en muizen ( ) zijn te infecteren met SARS-CoV isolaten en bruikbaar voor het uitvoeren van de studies in dit projectvoorstel. Klinische verschijnselen als gevolg van de SARS-CoV infectie zijn in deze diermodellen in verschillende mate geobserveerd; in katten verloopt de infectie grotendeels asymptomatisch, evenals in jonge Balb/c muizen. In oudere Balb/c muizen, fretten en hamsters zijn klinische verschijnselen gerapporteerd. Daarnaast zijn er additionele modellen in muizen gegenereerd op basis van transgene modellen ( ) dan wel aan de muis geadapteerde virusstammen ( ). Ook deze modellen zijn inzetbaar om de doelstellingen van dit projectvoorstel te halen.

Voor MERS-CoV infectie zijn dromedarissen om praktische redenen geen bruikbaar model. Onderzoek heeft aangetoond dat soort-specifieke variaties in de cellulaire receptor van MERS-CoV (DPP4) verantwoordelijk zijn voor het al dan niet kunnen binden van het virus en hiermee bepalen of een gastheer al dan niet geïnfecteerd kan worden. Hieruit is gebleken dat er geen binding plaatsvindt aan de



het DPP4 molecuul van diersoorten als de fret, muis, rat, hamster, en cavia. Middels dit *in vitro* vooronderzoek werd het konijn als bruikbaar diermodel voor MERS-CoV infectie geïdentificeerd, op basis van een relatief geconserveerde receptor t.o.v. die in de mens. Dit is vervolgens *in vivo* onderzocht en bevestigd. Net als in dromedarissen en kamelen laten MERS-CoV geïnfecteerde konijnen een bovenste luchtweginfectie zien ( ). Daarnaast bleek er ook in de onderste luchtwegen van het konijn virus aanwezig te zijn. Opvallend is dat de konijnen geen klinische symptomen laten zien na infectie met MERS-CoV (net als in dromedarissen en kamelen). Naast het preklinische konijnenmodel voor MERS-CoV infectie is er ook een zogenaamd knock-in muizenmodel beschikbaar ( ). Dit muizenmodel is gegenereerd door het gen dat codeert voor DPP4 te vervangen door het menselijke DPP4 gen (knock-in). Omdat het gen dat codeert voor menselijk DPP4 in dit muizenmodel onder controle staat van fysiologisch relevante transcriptiemechanismen wordt het gen enkel tot expressie gebracht in de respiratoire weefsels van de knock-in muis. Respiratoire challenge infectie met MERS-CoV leidt net als in dromedarissen (en eerdergenoemde konijnen) tot replicatie van het virus in luchtweg- en longweefsel. Ook in dit model werden geen klinische verschijnselen geobserveerd. Anders dan bij de konijnen is in dit muizenmodel wel sprake van histopathologische afwijkingen in de longen van geïnfecteerde dieren die overeenkomen met die in geïnfecteerde patiënten.

De opgevoerde modellen (muis, hamster, fret, konijn, kat) zullen gebruikt worden in de volgende gevallen, dit keuzeprocess is verduidelijkt in de flowchart (zie Appendix 1), in het bovenste deel:

Afhankelijk van de vooraf beschikbare informatie over het specifieke coronavirus en de uit te testen antivirale interventiestrategie zal een informed decision voor de keuze van het model gemaakt worden:

In het geval het antivirale interventiestrategieën tegen uitbraken van SARS-CoV zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis, hamster, fret, kat.

In het geval het antivirale interventiestrategieën tegen uitbraken van MERS-CoV zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis ( ), konijn ( ).

In het geval het antivirale interventiestrategieën tegen uitbraken met nieuwe coronavirusvarianten (X-CoV) zal in potentie gebruikt gemaakt kunnen gaan worden van elk van de opgevoerde modellen. Middels (pilot) dose finding studies zal het meest geschikte model geselecteerd worden, op basis van aantoonbare virusreplicatie in het betreffende model na infectie met deze nieuwe coronavirusvarianten.

De aanvrager voert deze studies uit als een zgn. CRO voor derden. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn.

### **Paraatheid**

Voor onderzoek aan (antivirale interventiestrategieën tegen) SARS- en MERS-CoV is dus een aantal diermodellen beschikbaar. Voor lopende ontwikkelingstrajecten van farmaceuten kunnen deze door de aanvrager ingezet worden om de studies gericht op de ontwikkeling van antivirale interventiestrategieën binnen de context van dit projectvoorstel uit te voeren. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de in dit projectvoorstel beschreven dierproeven gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS-CoV (2003) en MERS-CoV (2012) voor heeft gedaan. Dit kan dan gaan om nieuwe varianten van MERS- en SARS-CoV maar ook om een nieuwe coronavirusvariant (X-CoV). Omdat de MERS-CoV epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn. Indien deze uitbraak zich niet voordoet zal het werkelijke aantal gebruikte dieren en diersoorten dus een stuk minder zijn dan opgevoerd in het projectvoorstel.

Binnen onderzoeksprojecten als EMPIRE FP7 en globale surveillance initiatieven als ISARIC wordt wereldwijd gekeken of er zich mogelijk nieuwe virusuitbraken zouden kunnen voordoen. Enerzijds betekent dit het karakteriseren van virussen bij dieren die mogelijk kunnen overspringen naar de mens en anderzijds het karakteriseren van nieuwe virussen bij de mens en het ontwikkelen van interventiestrategieën. In de context van dit soort initiatieven wordt getracht een staat van paraatheid te verkrijgen die tot doel heeft toekomstige coronavirusuitbraken vergelijkbaar met SARS- en MERS-CoV in een vroeg stadium te detecteren zodat ontwikkeling van bestrijdingsmethoden zo snel mogelijk kan worden opgestart. Voor deze nieuwe coronavirussen (X-CoV) is het dus wenselijk om snel een diermodel te kunnen selecteren dat ingezet kan worden om de ontwikkeling van antivirale interventiestrategieën te ondersteunen.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

De doelstelling van het project is om door derden ontwikkelde biologische en/of farmaceutische middelen in preklinische modellen uit te testen op hun farmacokinetiek, immunogeniciteit en/of werkzaamheid om preventief dan wel therapeutisch te beschermen tegen (de gevolgen van) infecties met coronavirussen.

De doelstelling wordt haalbaar geacht omdat de aanvrager ervaring heeft met diermodellen voor coronavirusinfecties zoals SARS-CoV in fretten en katten ( ) en MERS-CoV in konijnen ( ). Daarnaast heeft de aanvrager uitgebreide ervaring op het gebied van respiratoire infecties in de beschreven diermodellen zoals infecties met influenza in muizen, fretten en katten, infectie met HRSV in muizen en fretten, infecties met HMPV in hamsters. Afhankelijk van het middel dat onderzocht gaat worden en de vraagstelling die de opdrachtgever(s) van de studies beantwoordt wenst (wensen), zal een keuze voor één van de modellen gemaakt worden. De overwegingen die hierin een rol spelen (te onderzoeken agens, toedieningsroutes en volumes, gewenste uitleesparameters) zullen bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD onderbouwd worden.

### 3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Een zoönotische transmissie en een daarop volgende transmissie van mens-op-mens van een virus kan zeer grote gevolgen hebben, zoals de uitbraken met hoog pathogene coronavirussen in de afgelopen jaren hebben aangetoond. Naast desastreuze effecten voor de gezondheid van de mens (10% en 40% mortaliteit voor SARS- resp. MERS-CoV) had deze uitbraak een enorme impact op de economie (voornamelijk in de Aziatische landen).

Op dit moment is de spreiding van MERS-CoV nog niet onder controle. Het virus maakt nog altijd slachtoffers in de regio in het Midden-Oosten waarin het voor het eerst werd geïdentificeerd met inmiddels meer dan 1200 gerapporteerde gevallen, waarvan ruim 500 fataal. Daarnaast deed zich eerder dit jaar de situatie voor dat een geïnfecteerde reiziger de bron was van een snel om zich heen grijpende uitbraak in Zuid-Korea waarbij in korte tijd 186 individuen geïnfecteerd raakten. De directe maatschappelijke gevolgen hiervan waren groot omdat drastische maatregelen nodig waren om deze uitbraak in te dammen: opsporen van hen die in contact waren geweest met geïnfecteerde individuen maar ook monitoring- en verstrekkende quarantainemaatregelen. Een aanzienlijk deel, in het geval van Zuid-Korea het grootste deel, van de besmettingen wordt opgelopen in ziekenhuissituaties. Met de juiste hygiënemaatregelen is een goede inperking van de verspreiding mogelijk, maar het gebrek aan antivirale middelen maakt efficiënte en doelgerichte bestrijding van deze uitbraken moeilijk en belastend. Hoe de MERS-CoV epidemie zich verder zal ontwikkelen is onduidelijk maar zolang ze niet onder controle is, blijft het risico aanzienlijk dat uitbraken zoals in Zuid-Korea zich zouden kunnen voordoen op iedere plaats in

de wereld.

Duidelijk is dus dat er een grote noodzaak is om interventiestrategieën tegen (toekomstige) uitbraken van hoog pathogene coronavirussen zoals SARS- en MERS-CoV te ontwikkelen. De recente MERS-CoV epidemie laat zien dat het wenselijk is om paraat te zijn om toekomstige uitbraken met al dan niet nieuwe coronavirussen adequaat te kunnen bestrijden. In het kader van globale paraatheid tegen toekomstige uitbraken met hoog pathogene coronavirussen is het van groot belang om de ontwikkeling van deze strategieën door te zetten en alle mogelijkheden daartoe in te zetten ( ). In eerste instantie is er een duidelijke behoefte aan antivirale middelen (antilichaampreparaten, antivirale middelen) die ingezet zouden kunnen worden om een uitbraak in ontwikkeling in te kunnen dammen en onder controle te krijgen. Niet alleen patiënten, maar zeker ook het ziekenhuispersoneel vormen concrete doelgroepen voor deze middelen. Verder geldt dat er zowel behoefte is aan preventieve als therapeutische producten. De ontwikkeling van een vaccin zou een belangrijke bijdrage leveren aan de preventieve behandeling van vele doelgroepen: zij die werkzaam zijn in de bedrijfstakken waarin blootstelling aan coronavirussen het geval is, hun directe contacten, ziekenhuispersoneel maar ook patiënten die opgenomen worden in een ziekenhuis waarin patiënten geïnfecteerd met coronavirussen in behandeling zijn, reizigers, etc. Het is ook niet ondenkbaar dat, gelijk aan de post-exposure profylactische behandeling van blootstelling aan rabiësvirus, een combinatie van farmaca en vaccin een effectieve behandelingsstrategie tegen coronavirusinfecties zal blijken.

Hiertoe is de beschikbaarheid van de in dit projectvoorstel beschreven preklinische modellen waarin deze interventiestrategieën kunnen worden onderzocht van grote waarde omdat deze ingezet kunnen worden voor het uittesten van antivirale interventiestrategieën tegen zowel bekende als nieuwe virusisolaten - in het geval van (nieuwe) uitbraken van SARS- en MERS-CoV. Daarnaast kunnen de beschreven en beschikbare modellen ingezet worden om het meest geschikte model te kiezen waarin antivirale interventiestrategieën tegen uitbraken met nieuwe, nu nog onbekende, coronavirussen onderzocht kunnen worden.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

#### 3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

In het kader van de ontwikkeling van vaccins en antivirale middelen (gezamenlijk: antivirale preparaten) tegen (uitbraken van) coronavirusinfecties biedt de aanvrager van dit projectvoorstel verschillende preklinische modellen aan om deze antivirale preparaten uit te testen. Deze modellen kunnen worden ingezet om ontwikkelde preparaten verschaft door derden/opdrachtgevers (in het algemeen farmaceutische bedrijven) uit te testen. De beschreven modellen zijn inzetbaar voor onderzoek aan antivirale interventiestrategieën tegen zowel bestaande (SARS-, MERS-) coronavirussen als tegen nieuwe coronavirussen die zich in de toekomst zouden kunnen manifesteren. Hierdoor wordt een bijdrage geleverd aan de in 3.1 beschreven gewenste paraatheid in het geval zich uitbraken voordoen zoals die zich in het verleden voor SARS- en MERS-CoV hebben voorgedaan.

De opgevoerde modellen (muis, hamster, fret, konijn, kat) zullen gebruikt worden in de volgende gevallen, dit keuzeprocess is verduidelijkt in de flowchart (zie Appendix 1), in het bovenste deel:

Afhankelijk van de vooraf beschikbare informatie over het specifieke coronavirus en de uit te testen antivirale interventiestrategie zal een informed decision voor de keuze van het model gemaakt worden:

In het geval het antivirale interventiestrategieën tegen uitbraken van SARS-CoV zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis, hamster, fret, kat. In fretten en katten is aangetoond dat SARS-CoV in deze dieren kan repliceren – het virus is in beide modellen aantoonbaar aanwezig in respiratoire monsters ( ) en de pathologische verschijnselen zijn beschreven ( ). Deze modellen zullen dan ook voornamelijk gebruikt kunnen worden in het geval van een nieuwe SARS-CoV uitbraak of in het geval van een uitbraak met een nieuw, nog onbekend CoV – waarbij in pilot (dose finding) experimenten getest kan worden of één van deze modellen geschikt zou zijn om antivirale interventiestrategieën tegen deze coronavirusvarianten op hun werkzaamheid te testen. Enkel als de pilot dose finding experimenten laten zien dat deze modellen geschikt zijn zal

van deze modellen gebruik gemaakt worden van de overige modules in het project/de flowchart.

In het geval het antivirale interventiestrategieën tegen uitbraken van MERS-CoV zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis ( ), konijn ( ). In beide modellen zijn virologische en pathologische verschijnselen beschreven en antivirale interventie studies gerapporteerd ( ); eigen ongepubliceerde studies ( ).

In het geval het antivirale interventiestrategieën tegen uitbraken met nieuwe coronavirusvarianten (X-CoV) zal in potentie gebruikt gemaakt kunnen worden van elk van de opgevoerde modellen. Middels (pilot) dose finding studies zal het meest geschikte model geselecteerd worden, op basis van aantoonbare virusreplicatie in het betreffende model na infectie met deze nieuwe coronavirusvarianten. Enkel die modellen waarin dit het geval is zullen geselecteerd kunnen worden voor het testen van antivirale interventiestrategieën tegen deze nieuwe coronavirusvarianten.

De farmaceutische bedrijven/opdrachtgever van de aanvrager maken gebruik van de expertise van de aanvrager voor het bepalen van het relevante preklinische model om een specifiek preparaat uit te testen. De resultaten verkregen in de studies beschreven in dit projectvoorstel kunnen door de opdrachtgevers worden gebruikt om de geteste antivirale preparaten verder te ontwikkelen voor toepassing in de mens teneinde (de gevolgen van) coronavirusinfecties te bestrijden.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Module 1: Dose finding coronavirusinfecties

Infectieprocedures. Afnameprocedures. Bemonstering van respiratoire weefsels middels swabs. Euthanasie.

Module 2: Gastheeradaptatie coronavirussen

Infectieprocedures. Afnameprocedures. Bemonstering van respiratoire weefsels middels swabs. Euthanasie.

Module 3: Time-course coronavirusinfecties

Infectieprocedures. Afnameprocedures. Bemonstering van respiratoire weefsels middels swabs. Euthanasie.

Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen

Toedieningsprocedures van antivirale preparaten (compounds, antilichaampreparaten). Afnameprocedures. Euthanasie.

Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten

Toedieningsprocedures van vaccinpreparaten. Afnameprocedures. Euthanasie.

Module 6: Werkzaamheid antivirale interventiestrategieën

Toedieningsprocedures van antivirale- en/of vaccinpreparaten. Afnameprocedures. Infectieprocedures. Bemonstering van respiratoire weefsels middels swabs. Euthanasie.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Afhankelijk van het gekozen preklinische model en de beschikbare informatie over het uit te testen antivirale preparaat wordt een selectie gemaakt uit de beschikbare Modules die nodig zijn om de specifieke doelstelling te beantwoorden. Voor het uitvoeren van studies om de werkzaamheid van antivirale preparaten uit te kunnen voeren in Module 6 van het project is het vaststellen van een aantal parameters vereist. Indien deze parameters niet (vanuit de opdrachtgever of vanuit eerdere studies) beschikbaar zijn kunnen deze worden bepaald in (een selectie uit) Modules 1 t/m 5.

Een flowchart waarin samenhang en fasering van de verschillende Modules is weergegeven is toegevoegd als Appendix 1. Hierin zijn de Modules als genummerde groene blokken weergegeven. Centraal staat Module 6, waarin de doelstelling van het project aangekaart wordt: het bepalen van de werkzaamheid van antivirale interventiestrategieën tegen coronavirusinfecties. Van bovenaf in de flowchart wordt het selectieproces van het te gebruiken virus-diermodel beschreven en welke parameters daarvoor bepaald dienen te worden in welke Modules (1-3, zie hieronder voor meer details). Van onderaf in de flowchart worden Modules (4-5) weergegeven die van belang zijn voor het bepalen van werkzaamheidsindicatoren van antivirale interventiestrategieën (PK of immunogeniciteitsstudies) voordat ze getest kunnen worden in Module 6.

Modules 1 t/m 3 dienen ter bepaling van de inputparameters en eindpunten van de coronavirusinfecties in de verschillende modellen die vastgesteld moeten worden voor de werkzaamheidsstudies in Module 6. Hiertoe wordt in Module 1 de optimale infectiedosis en –route voor het te gebruiken preklinische model bepaald. Indien blijkt dat er voor een preklinisch muizenmodel voor een bepaald coronavirus geen geschikte virusdosering vast te stellen is omdat het virus in de muis onvoldoende virulent is, bestaat de mogelijkheid om het virusisolaat te adapteren aan replicatie in de muis in Module 2. Met het aldus verkregen virus wordt vervolgens in Module 1 de optimale infectiedosis bepaald. Hierdoor ontstaat de mogelijkheid om in een klein diermodel interventiestrategieën uit te testen. De werkzame strategieën zouden vervolgens onderzocht kunnen worden in modellen gebaseerd op wild type virussen. Als zodanig kunnen deze studies een brug en selectiemoment vormen tussen in vitro studies en proefdierstudies in grotere diermodellen.

Met de optimale infectiedosis worden vervolgens in Module 3 de optimale eindpunten van de infectie bepaald voor de werkzaamheidsstudies in Module 6 op grond waarvan de werkzaamheid van antivirale preparaten kan worden vastgesteld aan de hand van de te gebruiken uitleesparameters.

Modules 4 en 5 dienen voor het bepalen van de optimale toedieningsschema's van de antivirale preparaten (antivirale middelen/compounds in Module 4 en vaccins in Module 5) die vastgesteld moeten worden voor de werkzaamheidsstudies in Module 6. Hiervoor worden in Module 4 studies uitgevoerd die dienen om de farmacokinetiek van antivirale middelen (compounds, antilichaampreparaten, etc.) in het gekozen preklinische model te bepalen. De resultaten van de studies in Module 4 worden gebruikt als input voor een keuzemoment (Go/No-Go) – indien uit de farmacokinetiek blijkt dat het middel ongeschikt is voor gebruik in het geselecteerde preklinische model zal geen werkzaamheidsstudie in Module 6 plaatsvinden en kan de keuze voor een ander preklinisch model overwogen worden indien uit analyses blijkt dat de gevonden farmacokinetiek diersoort specifiek is (bv. wanneer blijkt dat een omzetting van een pro-drug naar zijn actieve vorm in de geselecteerde diersoort niet plaatsvindt).

In Module 5 wordt de immunogeniciteit van kandidaat vaccins tegen coronavirussen bepaald. De resultaten worden gebruikt om de vaccinatieschema's voor werkzaamheidsstudies in Module 6 op te stellen. Ook hier is een keuzemoment ingebouwd: indien het kandidaat vaccin niet of onvoldoende immunogeen blijkt zal geen werkzaamheidsstudie uitgevoerd worden. Indien gewenst en/of mogelijk zou een nieuwe immunogeniciteitsstudie overwogen kunnen worden.

In Module 6 wordt de werkzaamheid van antivirale preparaten om preventief dan wel therapeutisch te beschermen tegen (de gevolgen van) infecties met coronavirussen bepaald in het geselecteerde preklinische model. Indien noodzakelijk worden de hiervoor benodigde gegevens gebruikt uit studies uitgevoerd in Modules 1 t/m 5.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Module 1: Dose finding coronavirusinfecties (DF)
2	Module 2: Gastheeradaptatie coronavirussen (GA)
3	Module 3: Time-course coronavirusinfecties (TC)
4	Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen (PK)

5	Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten (IMM)
6	Module 6: Werkzaamheid antivirale interventiestrategieën (EFF)
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u 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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|----------------|
| 1          | 120            |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

De experimenten in dit deel van het projectvoorstel zijn opgezet om de optimale dosis coronavirus te bepalen voor de verschillende preklinische modellen in het geval van nieuwe virusisolaten, –stammen of –preparaten (bv. in het geval van een nieuwe batch van een reeds eerder gebruikt virus). Nieuwe klinische isolaten kunnen voortkomen uit monsters van patiënten in een nieuwe coronavirusuitbraak, zoals bv. recentelijk in Zuid-Korea (WHO 2015). Het is nog onbekend in hoeverre de verschillende coronavirussen evolueren, al zijn daarvoor inmiddels screeningsmethoden beschikbaar (■■■■■■■■■■), waardoor het in de toekomst noodzakelijk kan zijn om voor gemuteerde isolaten nieuwe dose-finding studies uit te voeren. De opgevoerde modellen (muis, hamster, fret, konijn, kat) zullen gebruikt worden in de volgende gevallen, dit keuzeprocess is verduidelijkt in de flowchart (zie Appendix 1), in het bovenste deel:

Afhankelijk van de vooraf beschikbare informatie over het specifieke coronavirus en de uit te testen antivirale interventiestrategie zal een informed decision voor de keuze van het model gemaakt worden:

In het geval het om (pilot) dose finding gaat van SARS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis, hamster, fret, kat.

In het geval het om (pilot) dose finding gaat van MERS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis (■■■■■■■■■■), konijn (■■■■■■■■■■).

In het geval het om (pilot) dose finding gaat van nieuwe coronavirusvarianten (X-CoV) zal in potentie gebruikt gemaakt kunnen gaan worden van elk van de opgevoerde modellen. Middels deze (pilot) dose finding studies zal het meest geschikte model geselecteerd worden, op basis van aantoonbare virusreplicatie in het betreffende model na infectie met deze nieuwe

coronavirusvarianten.

De aanvrager voert deze studies uit als een zgn. CRO voor derden. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de asymptomatische MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn. Om de optimale infectiedosis te bepalen zullen de dieren intranasaal (i.n.) en/of intratracheaal (i.t.) geïnoculeerd worden met verschillende doseringen van het uit te testen viruspreparaat. De primaire uitleesparameters zijn virus load in respiratoire monsters (neus- en/of keelwabs, longmateriaal bij necropsie) en (histo)pathologie op respiratoire weefsels. In alle modellen is virale load meetbaar en, naast informatie uit (histo)pathologische analyses, bepalend voor de optimale infectiedosis. Deze virale load wordt zowel middels titratie van afgenomen monsters op cellijnen bepaald als middels moleculaire methoden (quantitatieve RT-PCR).

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De experimenten die in dit deel van het project uitgevoerd worden bestaan uit twee fases, die onafhankelijk van elkaar gebruikt kunnen worden, afhankelijk van het uit te testen viruspreparaat en de reeds beschikbare informatie.

### **Fase 1. Pilot dose finding**

Deze fase dient om de virusdosis van nieuwe isolaten of stammen vast te stellen voor dose-finding in Fase 2. Tevens kan deze Fase gebruikt worden om een zgn. dosis-bevestiging uit te voeren in het geval van bv. een nieuw geproduceerd preparaat van een reeds uitgetest virus. In dat laatste geval volgt er dus geen Fase 2 en kunnen de resultaten direct gebruikt worden in Module 6.

### **Fase 2. Dose finding**

Gebaseerd op de resultaten verkregen in Fase 1 kan deze Fase gebruikt worden om de optimale infectiedosis te bepalen voor de werkzaamheidsstudies in Module 6. Tevens kunnen virusisolaten verkregen in Module 2 (gasheeradaptatie in muizen) in deze fase getest worden om de optimale infectiedosis te bepalen.

Voor beide Fasen is de behandeling van de dieren, na acclimatisatie van minimaal een week, als volgt:

Voor of op dag 0: markeren ter identificatie, bloedafname onder adequate sedatie indien nodig, bemonsteren van de luchtweg middels een neus- en/of keelwab (referentiemonsters)

Dag 0: i.n. en/of i.t. infectie met een coronaviruspreparaat onder adequate sedatie voor de diersoort en de behandeling; wegen

Dag 0 – x: dagelijks wegen en bemonsteren van de luchtweg middels een neus- en/of keelwab. Tevens zullen de dieren geobserveerd worden voor het eventueel optreden van klinische verschijnselen. Deze zijn, dan doorgaans respiratoir van aard.

Dag x: euthanasie. Respiratoire weefsels zullen worden geïsoleerd teneinde de uitleesparameters (virologie, (histo)pathologie) te kunnen bepalen.

Voor de nu bekende coronavirussen is uiterlijk dag 7 het te verwachten eindpunt. Voor nieuwe virussen/stammen zou een later tijdstip wenselijk kunnen zijn. Indien dit het geval is wordt dit middels de werkprotocollen afgestemd met de IvD.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

MERS-CoV is een betrekkelijk recent geïdentificeerd virus en de hoeveelheid beschikbare gegevens uit eigen studies en publicaties is daardoor beperkt. Gegevens verkregen met een soortgelijk virus (SARS-CoV) zijn meegenomen in de overwegingen voor het bepalen van de benodigde aantallen dieren. Indien uit voortschrijdend inzicht blijkt dat deze studies met minder dieren uitgevoerd kunnen worden zullen de bij de IvD in te dienen werkprotocollen daarop aangepast worden.

### **Fase 1. Pilot dose finding**

Per dosis zullen ■ dieren geïnfecteerd worden. Aangezien bij een dose-finding de verschillende groepen met



elkaar vergeleken kunnen worden en het een pilot-experiment betreft, is onze ervaring dat het mogelijk is om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren.

**Fase 2. Dose finding**

Om zeker te zijn van significante resultaten zal in deze fase een groepsgrootte van [ ] dieren aangehouden worden voor de studies in muizen ( [ ] ). Van de overige diersoorten in dit projectvoorstel wordt voor deze fase een groepsgrootte van [ ] dieren gehanteerd, gebaseerd op gepubliceerde gegevens over deze diersmodellen en eigen, niet gepubliceerde studies ( [ ] ).

Voor pilot dose finding studies worden [ ] groepen per studie gebruikt: in het geval van nieuwe coronavirusisolaten wordt gekozen voor een lage, medium en hoge dosering. Aan de hand van de resultaten hiervan wordt een verfijnde doseringsrange gekozen voor de dose finding studies, hiervoor worden voor muisstudies [ ] groepen per studie gebruikt. Voor de grotere diersmodellen wordt een kleiner aantal ( [ ] ) groepen gebruikt.

Gebaseerd op het aantal studies dat verwacht wordt in de komende 5 jaar, is het maximum aantal dieren dat gebruikt zal worden over die periode uitgerekend. Het aantal dieren per groep, groepen per studie en het aantal te verwachten studies over de projectperiode levert de dieraantallen in de tabel op.

Dit maximum is een schatting omdat aanvrager deze studies uitvoert als een zgn. CRO voor derden. Het exacte aantal benodigde dieren is afhankelijk van het aantal contracten dat in die periode zal worden afgesloten. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn.

De tabel hieronder geeft per fase het aantal benodigde dieren voor dit deel van het projectvoorstel weer.

Module 1 Fase	Diersoort	Groeps-grootte	Geschat aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar
1	Muis wildtype	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
	Muis transgeen			[ ]	[ ]
	Fret			[ ]	[ ]
	Kat			[ ]	[ ]
	Hamster			[ ]	[ ]
	Konijn			[ ]	[ ]
2	Muis	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
	Muis transgeen			[ ]	[ ]
	Fret	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]
	Kat			[ ]	[ ]
	Hamster			[ ]	[ ]
	Konijn			[ ]	[ ]

**B. De dieren**

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

De farmaceutische bedrijven/opdrachtgever van de aanvrager maken gebruik van de expertise van de aanvrager voor het bepalen van het relevante preklinische model om een specifiek preparaat uit te testen.

Voor het testen van antivirale preparaten gericht op de bestrijding van SARS-CoV zijn bij de aanvrager de volgende preklinische modellen beschikbaar: Fret, kat, hamster en muis.

Voor het testen van antivirale preparaten gericht op de bestrijding van MERS-CoV zijn bij de aanvrager de volgende preklinische modellen beschikbaar: Konijn en muis.

In het geval van een uitbraaksituatie met een nieuw coronavirus (X-CoV) zal middels beschikbare virologische, epidemiologische en klinische informatie, in vitro onderzoek maar eventueel ook middels (pilot) dose finding studies in Module 1 een geschikt preklinisch model voor dit nieuwe virus geselecteerd kunnen worden

Afhankelijk van het middel dat onderzocht gaat worden en de vraagstelling die de opdrachtgever(s) van de studies beantwoord wenst (wensen), zal een keuze voor één van de modellen gemaakt worden. De overwegingen die hierin een rol spelen (te onderzoeken agens, toedieningsroutes en volumes, gewenste uitleesparameters) zullen bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD onderbouwd worden.

Soort en levensstadia: afhankelijk van het gekozen coronavirus zal het meest relevante diermodel gekozen worden, waarbij vatbaarheid voor het gekozen coronavirus een belangrijke rol speelt. In huis gegenereerde en misschien niet publiekelijke resultaten, maar ook wetenschappelijke publicaties vormen de basis voor deze keuze. De verschillende leeftijden voor de verschillende modellen zijn hieronder weergegeven op basis van wetenschappelijke publicaties, maar kunnen bijgesteld worden indien additionele data beschikbaar zijn. Indien het laatste het geval is zullen deze data voorgelegd worden aan de IvD ter beoordeling.

Muizen ( $\geq 5$  wk: [redacted]), fretten ( $\geq 3$  mnd: [redacted]), katten ( $\geq 8$  wk: [redacted]), hamsters ( $\geq 5$  wk, [redacted]), konijnen ( $\geq 6$  mnd: [redacted]). Bij muizen kan gebruik gemaakt worden van transgene dieren die ofwel de receptor voor SARS-CoV ([redacted]), ofwel de receptor voor MERS-CoV ([redacted]) tot expressie brengen.

Herkomst: Geregistreerde fok/leverancier. In het geval van transgene muizen worden deze betrokken van de instellingen waarin deze gegenereerd zijn.

De keuze voor specifieke geslachten is gebaseerd op aanwezige dan wel gepubliceerde informatie – zie hieronder de onderbouwing per model.

- Hamster – vrouw ([redacted])
- Muis, wild type coronavirussen
  - Balb/c – vrouw ([redacted])
  - Tg – geen specificatie ([redacted])
- Muis, aangepaste coronavirussen
  - Balb/c – vrouw ([redacted])
- Konijn – vrouw ([redacted])
- Fret, man/vrouw – ([redacted])
- Kat, vrouw – ([redacted])

De keuze van het geslacht zal meegenomen in de aanvraag van de verschillende dierproeven die uitgevoerd zullen worden binnen dit project en deze keuze zal ook voorgelegd en beoordeeld worden door de IvD. Hierin zullen de onderstaande overwegingen meegenomen worden, niet gerangschikt op basis van prioriteit in de overweging:

- Bepaalde keuze van geslacht vanuit wetenschappelijk of regelgevend oogpunt.
- Beschikbaarheid van de dieren (van een bepaald geslacht);
- Eerder uitgevoerde experimenten (al dan niet uitgevoerd door de aanvrager of gecommuniceerd door de opdrachtgever aan de aanvrager) waarmee vergeleken dient te worden;

Bij het aanvragen van de verschillende dierproeven zal toezicht gehouden worden (door middel van toetsing van werkprotocollen inclusief de rechtvaardiging voor het geslacht bij IvD) over het gelijkwaardig gebruik van de verschillende geslachten tussen de dierproeven.

Los van bovenstaande argumenten willen wij nog toevoegen dat voor experimenten waarbij ook inperking een belangrijke factor is (BSL klasse II of III), er een logistiek probleem is in het uitvoeren van dierproeven met beide geslachten. Zoals in de bijlage benoemd zullen de experimenten onder zeer gecontroleerde omstandigheden uitgevoerd worden, waarbij bij experimenten met coronavirussen altijd gebruik gemaakt wordt voor de hoogst mogelijke inschaling BSL III (en dus isolator huisvesting) in verband met potentiële aerosol transmissie tussen groepen maar ook van dieren naar onderzoekers/biotechnici. Per isolator kan maar één sexe worden gehuisvest.

Geschatte aantallen, totaal per diersoort, zie de tabel in 2A voor de onderliggende berekening:

Muis (wildtype): [redacted]

Muis (transgeen): [redacted]

Fret: [redacted]

Kat: ■  
Hamster: ■  
Konijn: ■

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Het bepalen van de optimale infectiedosis voor gebruik in time-course (Module 3) en werkzaamheidsstudies (Module 6) kan enkel plaatsvinden in de in die modules te gebruiken dieren. De virologische en (histo)pathologische parameters die hiervoor van belang zijn kunnen niet in proefdierlijke alternatieven gegenereerd worden.

Vermindering: Het ingeschatte aantal dieren is bepaald op de (soms) beperkte hoeveelheid informatie die voor de betreffende preklinische modellen beschikbaar is. Indien uit studies uit te voeren in het huidige project blijkt dat, bv. door beperkte spreiding in de uitkomsten, met minder dieren evengoed robuuste resultaten te behalen zijn zal dit voortschrijdende inzicht gebruikt worden voor het opstellen van werkprotocollen waarin deze vermindering concreet gemaakt wordt.

Verfijning: De gekozen modellen zijn de enige tot dusver beschikbare modellen voor de beschreven coronavirusinfecties. Bij de keuze van het te gebruiken model voor een specifieke studie zal een nauwkeurige afweging gemaakt worden op basis van het te testen preparaat en de bijbehorende achtergrondinformatie, het beoogde virale agens (SARS-, MERS- of een nog onbekend coronavirus: X-CoV) en de gewenste uitleesparameters. Deze overwegingen zullen overlegt worden aan de IvD bij het indienen van de werkprotocollen voor uitvoering van de studies in het kader van dit project.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De infectieprocedures worden onder voor de diersoort adequate sedatie uitgevoerd. De dieren worden dagelijks verzorgd en geobserveerd om de gezondheidsstatus bij te houden en hun welzijn te garanderen. Er zijn humane eindpunten gedefinieerd om onnodig ernstig ongerief te voorkomen (zie J.).

Nadelige milieueffecten worden tot een minimum beperkt doordat gewerkt wordt onder DM-III omstandigheden in faciliteiten waarvoor destructie- en afvoerprocedures voor afval vastgelegd zijn.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## **Ongeriefinschatting/humane eindpunten**

### **H. Pijn en pijnbestrijding**

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Intratracheale infectieprocedures worden uitgevoerd onder voor de diersoort adequate anesthesie.

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Afhankelijk van de virulentie van de gebruikte virusstam en de proefdiersoort kan er in meer dan wel mindere mate sprake zijn van klinische symptomen als gevolg van de coronavirusinfectie. De klinische symptomen die voor de preklinische modellen die in dit projectvoorstel gebruikte worden zijn met name respiratoir van aard: deze kenmerken zich door een verhoogde ademhalingsfrequentie tot moeizaam ademen waarbij de flanken zichtbaar overdreven ingetrokken worden, de dieren gestrekt gaan liggen (teneinde de luchtwegen zoveel mogelijk toegankelijk te houden) en lethargisch zijn en/of een stokkende ademhaling (dyspneu). Zie ook humane eindpunten bij sectie J.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak is de coronavirusinfectie.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Tweemaal daags observatie van de dieren vanaf infectie. De observatiefrequentie zal verhoogd worden indien nodig, mochten observaties daartoe aanleiding geven. Er zijn humane eindpunten gedefinieerd, zie J.

### **J. Humane eindpunten**

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane

eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Infecties met coronavirussen kunnen, afhankelijk van het model, leiden tot een ziektebeeld dat gekenmerkt wordt door respiratoire problemen, dyspneu (zie voor omschrijving hiervan de humane eindpunten hieronder), afwezigheid van eetlust, lethargie en gewichtsverlies. Na infectie zullen de dieren uitvoerig gevolgd worden voor het detecteren van deze verschijnselen.

De dieren worden geëuthanaseerd als zich één of enkele van de volgende omstandigheden zich voor doen:

1. Het dier eet of drinkt niet meer
2. Afname lichaamsgewicht (de dieren worden na infectie dagelijks gewogen):
  - a. > 15% in 2 dagen
  - b. > 20% t.o.v. aanvangsgewicht
3. Er kan sprake zijn van matig-ernstige ademhalingsproblemen als gevolg van de coronavirusinfectie: deze kenmerken zich door een verhoogde ademhalingsfrequentie (matig ongerief, geen humaan eindpunt) tot moeizaam ademen waarbij de flanken zichtbaar overdreven ingetrokken worden, de dieren gestrekt gaan liggen (teneinde de luchtwegen zoveel mogelijk toegankelijk te houden) en lethargisch zijn (deze combinatie wordt ingeschaald als ernstig ongerief) of een stokkende ademhaling (dyspneu) (beide zijn humane eindpunten).

De beschreven HEP's zijn algemeen van toepassing op infecties met virussen die impact hebben op het respiratoire systeem van de verschillende diermodellen, zoals voor de bekende SARS/MERS modellen. De aanname dat deze HEP's ook op infecties met nieuwe coronavirusvarianten in deze modellen van toepassing zijn is dan ook reëel. Er is uitgebreide ervaring bij het personeel van de aanvrager in studies met respiratoire infecties en de toepassing van de bijbehorende HEP's waardoor toepassing ervan bij nieuwe virusvarianten nauwgezet plaats zal kunnen vinden.

De virusreplikatiekinetiek in de beschreven modellen verloopt doorgaans binnen een periode van 7 dagen, zowel voor asymptomatische modellen als voor modellen waarbij klinische verschijnselen optreden: voor SARS infecties bij fretten en in ACE2 muizen zijn 2 – 5 dagen na infectie HEP te verwachten.

Humane eindpunten die zich sporadisch kunnen voordoen in dierstudies in het algemeen zijn:

4. Het dier vertoont onbehandelbare wonden door bv. vechten of op andere wijze opgelopen.
5. Het dier vertoont een matig-ernstig afwijkend gedrags- en voortbewegingspatroon.

De dieren worden na de infectie tweemaal daags bekeken voor klinische symptomen. De observatiefrequentie zal verhoogd worden indien nodig, mochten observaties daartoe aanleiding geven. Hierop zal bij ieder individueel experiment toegezien worden – het verloop van (pilot) dose finding studies in deze module zal in het geval van onbekende coronavirus preparaten (nieuwe varianten, batches, combinaties) veel gerichte data/informatie opleveren om de observatiefrequentie indien nodig te kunnen specificeren voor de studies in de overige modules.

Er zijn vooralsnog geen andere symptomen te verwachten.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Gepubliceerde coronavirusinfecties in katten, hamsters en konijnen verlopen zonder klinische verschijnselen. In fretten is bij SARS-CoV infecties in 50% van de dieren lethargie gerapporteerd (██████████). In jonge inteeltmuizen verloopt de SARS-CoV infectie eveneens asymptomatisch. In oude (12 mnd) Balb/c muizen zijn klinische verschijnselen als opstaande haren, gewichtsverlies (< 10%) en lichte dehydratie gerapporteerd (██████████). In huDPP4 knock-in muizen die voor MERS-CoV infecties gebruikt worden verloopt de infectie zonder manifestatie van klinische verschijnselen (██████████). Samenvattend lijkt de kans op het bereiken van de humane eindpunten in deze modellen zeer klein (<5%). In ACE2 transgene muizen geïnfecteerd met SARS-CoV zijn klinische verschijnselen als >20% gewichtsverlies en mortaliteit gerapporteerd (██████████). In dit model zal in dose-finding studies dan ook waarschijnlijk ~50% een humaan eindpunt zal bereiken. In het geval dat er dose finding studies uitgevoerd worden met aan de muis geadapteerde virusstammen

afkomstig uit Module 2 is het gezien eerdere publicaties van soortgelijke experimenten met SARS-CoV aannemelijk dat afhankelijk van de dosering >20% gewichtsverlies binnen 3-5 dagen kan optreden. In dit model zal in dose-finding studies dan ook waarschijnlijk ~50% een humaan eindpunt bereiken.

Voor dose finding studies van nog onbekende coronavirussen (bv. isolaten van een toekomstige uitbraak) is een inschatting op voorhand niet te maken. De ervaring van de aanvrager met respiratoire infecties in de modeldieren en de heldere humane eindpunten dragen echter bij aan een minimalisatie van het op te treden ongerief.

De kans op het optreden van de algemene humane eindpunten (4 en 5) wordt zeer klein geacht,  $\leq 1\%$ .

#### **K. Classificatie van ongerief**

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Coronavirusinfecties in katten, hamsters en konijnen en in enkele Balb/c muizenmodellen verlopen zonder klinische verschijnselen. Het maximale cumulatieve ongerief in deze modellen in het geval van (pilot) dose finding studies is dan ook ingeschaald als licht.

De beschreven HEP's voor modellen met klinische verschijnselen verminderen het optreden van ernstig ongerief, maar 100% garantie op het voorkomen ervan is niet af te geven. Kortdurend ernstig ongerief in modellen met klinische symptomen (fretten, ACE2 Tg muizen, Balb/c muizen in enkele modellen) is dan ook niet uit te sluiten maar dit zal tot een minimum beperkt worden door verhoogde observatiefrequentie wanneer dit noodzakelijk wordt geacht. Voor deze modellen kan voor een deel van de dieren (zie ook J) het maximale cumulatieve ongerief dan ook als ernstig worden ingeschaald. De beschreven HEP's zijn van toepassing op infecties met virussen die impact hebben op het respiratoire systeem van de verschillende diermodellen, zoals voor de bekende SARS/MERS modellen, maar ook voor bv. infectiemodellen voor hoogpathogene influenzavirussen. Met al deze modellen heeft de aanvrager veel ervaring, waardoor nauwkeurige ongeriefinschatting en bepaling van het bereiken van HEPs in de experimenten gewaarborgd is.

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De dieren kunnen na infectie met een coronavirus niet voor andere doeleinden gebruikt worden: SARS- en MERS-CoV zijn beide geclassificeerd als BSL-3, voor nieuw geïsoleerde virusstammen in uitbraaksituaties is de verwachting dat ook deze als zodanig geclassificeerd zullen worden. Daarnaast zal de virale load en (histo)pathologische afwijkingen in longmateriaal en ander respiratoire weefsels bepaald worden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u 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.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Module 2: Gastheeradaptatie coronavirussen

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Indien uit (pilot) dose finding studies in Module 1 blijkt dat voor een preklinisch muizenmodel de pathogeniciteit van het uit te testen coronaviruspreparaat te laag is kunnen studies in deze Module (2) gebruikt worden om middels seriële passage in muizen gastheeradaptatie te realiseren.

Gebruik van aan muizen geadapteerde coronavirussen heeft een toegevoegde waarde t.o.v. de beschikbare (asymptomatische) modellen in wildtype muizen. Naast kwantitatieve virologische uitleesparameters kan in dit model potentiëel (afhankelijk van de mate van adaptatie en toegenomen virulentie) ook gebruik gemaakt worden van (histo)pathologische uitleesparameters die relevant zijn voor het verloop van de infectie bij mensen die ernstige respiratoire gevolgen ondervinden: histopathologische veranderingen in longen, longviremie, verspreiding naar andere organen, klinische indicatoren en veranderingen in bloedwaarden (lymphopenia en neutrophilia).

Daarnaast zullen vanwege de hogere virulentie van deze virussen in dit diermodel aantoonbaar effectieve behandelmethoden in dit meer stringente infectiemodel een grotere kans hebben om (klinisch) effectief te zijn in mensen.

Op basis van beschikbare literatuurgegevens zijn tussen de 15 en 25 passages benodigd om het gewenste fenotype te realiseren ( ). Op deze wijze komt een klein diermodel beschikbaar dat het mogelijk maakt om werkzaamheidsstudies uit te voeren aan antivirale interventiestrategieën als brug tussen in vitro studies en preklinische studies in modellen waarin van wildtype virussen gebruik gemaakt wordt (selectiemoment). Deze muis-geadapteerde virusstammen kunnen vervolgens gebruikt worden in het preklinische muizenmodel om studies uit te voeren in Modules 1 en 3 om de virologische eindpunten te bepalen die gebruikt kunnen worden om werkzaamheidsstudies in dit model uit te voeren in Module 6.

Om de gastheeradaptatie te realiseren zullen muizen intranasaal (i.n.) geïnoculeerd worden met een hoge dosering (gebaseerd op de uitkomsten van studie(s) in Module 1). Een hoge dosering coronavirus zal

intranasaal worden toegediend aan de muizen. Twee tot zeven dagen na infectie (afhankelijk van beschikbare informatie uit bv. (pilot)dose finding studies) zullen de muizen worden geëuthanaseerd, waarna respiratoire weefsels zullen worden geïsoleerd voor virologische analyses én het prepareren van het inoculum voor de volgende passage. Hiertoe worden geogste longen gehomogeniseerd en gecentrifugeerd waarna het supernatant zal dienen als inoculum voor intranasale toediening. De primaire uitleesparameters zijn virus load in respiratoire monsters (keelwabs, longmateriaal bij necropsie). Bij toenemende pathogeniciteit kan overleving een additionele uitleesparameter zijn. Indien geen adaptatie mogelijk blijkt, dan zullen er geen vervolgstudies met de preparaten in overige modules van dat specifieke muizenmodel plaatsvinden.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Gebaseerd op de resultaten verkregen in Module 1, wanneer een virus in het preklinische muizenmodel niet pathogeen genoeg is, kan deze Module gebruikt worden om gastheeradaptatie in de muis te realiseren. De verkregen viruspreparaten kunnen vervolgens gebruikt worden in Modules 1 en 3 voor dose-finding en time-course bepaling waarna het preparaat geschikt is om in Module 6 gebruikt te worden in werkzaamheidsstudies.

De behandeling van de dieren, na acclimatisatie van minimaal een week, is voor iedere passage als volgt: Voor of op dag 0: markeren ter identificatie, bemonsteren van de luchtweg middels een neus- en/of keelwab (referentiemonsters)

Dag 0: i.n. infectie met een coronaviruspreparaat; wegen

Dag 0 – 7: dagelijks wegen en bemonsteren van de luchtweg middels een keelwab. Observeren op ontstaan klinische verschijnselen.

Dag x (max. dag 7): euthanasie. Tijdstip is afhankelijk van beschikbare informatie, bv. uit (pilot) dose-finding experimenten in Module 1. Respiratoire weefsels zullen worden geïsoleerd teneinde de uitleesparameters (virus load) uit te kunnen lezen en het preparaat te genereren om de volgende infectie (passage) uit te voeren.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Gebaseerd op soortgelijke experimenten in muizen voor influenza A ( ), B ( ) en ook SARS-CoV ( ) adaptatie, zal kunnen worden voldaan met ■ muizen per passage. Voor de eerder gerapporteerde SARS-CoV adaptatie bleken 15 tot 25 passages benodigd.

Gebaseerd op het aantal studies dat verwacht wordt in de komende 5 jaar, is het maximum aantal dieren dat gebruikt zal worden over die periode uitgerekend op ■. Dit maximum is een schatting omdat aanvrager deze studies uitvoert als een zgn. CRO voor derden. Het exacte aantal benodigde dieren is afhankelijk van het aantal contracten dat in die periode zal worden afgesloten. De tabel hieronder geeft per fase het aantal benodigde dieren voor dit deel van het projectvoorstel weer.

Groeps-grootte	Maximum aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar
■	■	■	■

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

Soort en levensstadia: Muizen, vrouw, wildtype zoals bv. Balb/c (>5 wk) ( ).

De keuze voor vrouwelijke muizen is gebaseerd op gepubliceerde informatie voor adaptatie van coronavirussen aan replicatie in muizen ( ).

Verder willen wij nog toevoegen dat voor experimenten waarbij ook inperking een belangrijke factor is (BSL klasse II of III), er een logistiek probleem is in het uitvoeren van dierproeven met beide geslachten. Zoals in de bijlage benoemd zullen de experimenten onder zeer gecontroleerde omstandigheden uitgevoerd worden,



waarbij bij experimenten met coronavirussen altijd gebruik gemaakt wordt voor de hoogst mogelijke inschaling BSL III (en dus isolator huisvesting) in verband met potentiële aerosol transmissie tussen groepen maar ook van dieren naar onderzoekers/biotechnici. Per isolator kan maar één sexe worden gehuisvest.

Herkomst: Geregistreerde fok/leverancier.

Geschatte aantallen, totaal, zie de tabel in 2A voor de berekening: [REDACTED]

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Gastheeradaptatie van een coronavirus kan enkel in respiratoire systemen van intacte dieren plaatsvinden. De virologische parameters en preparaten die hiervoor van belang zijn kunnen niet in proefdierrijke alternatieven gegenereerd worden.

Vermindering: Het ingeschatte aantal dieren is bepaald op gegevens beschikbaar uit vergelijkbare studies met andere respiratoire- en coronavirussen waardoor er met een klein aantal ([REDACTED]) dieren per groep voldoende zekerheid is dat de doelstelling gehaald kan worden.

Verfijning: Gastheeradaptatie van een coronavirus aan replicatie in muizen kan enkel in respiratoire systemen van het intacte doeldier plaatsvinden. Gastheeradaptatie kan resulteren in robuustere eindpunten dan die voor de nu beschikbare preklinische modellen met hun virologische en (histo)pathologische uitleesparameters waardoor toekomstige werkzaamheidsstudies met minder dieren zouden kunnen worden opgezet.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De dieren worden dagelijks verzorgd en geobserveerd om de gezondheidsstatus bij te houden en hun welzijn te garanderen. Gerapporteerde coronavirusinfecties in muizen verlopen asymptomatisch, al is de verwachting dat bij oplopend passagenummer van het te adapteren virus klinische verschijnselen zich zullen manifesteren. Er zijn voor dit preklinische model humane eindpunten geïdentificeerd (zie J.).

Nadelige milieueffecten worden tot een minimum beperkt doordat gewerkt wordt onder DM-III omstandigheden in faciliteiten waarvoor destructie- en afvoerprocedures voor afval vastgelegd zijn.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Naarmate het passagenummer toeneemt, kan er in meer dan wel mindere mate sprake zijn van klinische symptomen als gevolg van de coronavirusinfectie. De klinische symptomen zijn met name respiratoir van aard: deze kenmerken zich door een verhoogde ademhalingsfrequentie tot moeizaam ademen waarbij de flanken zichtbaar overdreven ingetrokken worden, de dieren gestrekt gaan liggen (teneinde de luchtwegen zoveel mogelijk toegankelijk te houden) en lethargisch zijn en/of een stokkende ademhaling (dyspneu). Zie ook humane eindpunten bij sectie J.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Infectie met een voor de muis pathogeen coronavirus.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Tweemaal daags observatie van de dieren. Er zijn humane eindpunten gedefinieerd (zie J.).

### J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Infecties van muizen met coronavirussen kunnen, naarmate het virus pathogener wordt (wat verwacht kan worden bij een toenemend passagenummer), leiden tot een ziektebeeld dat gekenmerkt wordt door respiratoire problemen (zie voor omschrijving hiervan de humane eindpunten hieronder), afwezigheid van eetlust, lethargie en gewichtsverlies. Na infectie zullen de dieren uitvoerig gevolgd worden voor het detecteren van deze verschijnselen.

De dieren worden geëuthanaseerd als zich één of enkele van de volgende omstandigheden zich voor doen:

1. Het dier eet of drinkt niet meer
2. Afname lichaamsgewicht (de dieren worden na infectie dagelijks gewogen):
  - a. > 15% in 2 dagen
  - b. > 20% t.o.v. aanvangsgewicht
3. Er kan sprake zijn van matig-ernstige ademhalingsproblemen als gevolg van de coronavirusinfectie: deze kenmerken zich door een verhoogde ademhalingsfrequentie (matig ongerief, geen humaan eindpunt) tot moeizaam ademen waarbij de flanken zichtbaar overdreven ingetrokken worden, de dieren gestrekt gaan liggen (teneinde de luchtwegen zoveel mogelijk toegankelijk te houden) en lethargisch zijn (deze combinatie wordt ingeschaald als ernstig ongerief) of een stokkende ademhaling (dyspneu) (beide zijn humane eindpunten).

De beschreven HEP's zijn algemeen van toepassing op infecties met virussen die impact hebben op het respiratoire systeem van de verschillende diermodellen, zoals voor de bekende SARS/MERS modellen. De aanname dat deze HEP's ook op infecties met nieuwe coronavirusvarianten in deze modellen van toepassing zijn is dan ook reëel. Er is uitgebreide ervaring bij het personeel van de aanvrager in studies met respiratoire infecties en de toepassing van de bijbehorende HEP's waardoor toepassing ervan bij nieuwe virusvarianten nauwgezet plaats zal kunnen vinden.

De virusreplikatiekinetiek in de beschreven modellen verloopt doorgaans binnen een periode van 7 dagen, zowel voor asymptomatische modellen als voor modellen waarbij klinische verschijnselen optreden.

Humane eindpunten die zich sporadisch kunnen voordoen in dierstudies in het algemeen zijn:

4. Het dier vertoont onbehandelbare wonden door bv. vechten of op andere wijze opgelopen.
5. Het dier vertoont een matig-ernstig afwijkend gedrags- en voortbewegingspatroon.

De dieren worden na de infectie tweemaal daags bekeken voor klinische symptomen. De observatiefrequentie zal verhoogd worden indien nodig, mochten observaties daartoe aanleiding geven. Hierop zal bij ieder individueel experiment toegezien worden – informatie uit (pilot) dose finding studies en de studies in deze module zal in het geval van onbekende coronavirus preparaten veel gerichte data/informatie opleveren om de observatiefrequentie indien nodig te kunnen specificeren voor de studies in de overige modules.

Er zijn vooralsnog geen andere symptomen te verwachten.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Gezien eerdere publicaties van soortgelijke experimenten met SARS-CoV [REDACTED] is aannemelijk dat afhankelijk van de dosering >20% gewichtsverlies binnen 3-5 dagen kan optreden vanaf het moment dat een virus pathogeen wordt voor muizen. In deze studies dan ook waarschijnlijk dat in latere passages alle geïnfecteerde muizen een humaan eindpunt bereiken.

De kans op het optreden van de algemene humane eindpunten (4 en 5) wordt zeer klein geacht,  $\leq 1\%$ .

### **K. Classificatie van ongerief**

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Dieren die een humaan eindpunt bereiken kunnen kortdurend ernstig ongerief ervaren, dit wordt door frequente observatie door ervaren personeel beperkt tot een minimum. De beschreven HEP's verminderen het optreden van ernstig ongerief, maar 100% garantie op het voorkomen ervan is niet af te geven. De kans op het bereiken van HEP's kan toenemen in het geval van adaptatie van coronavirussen aan replicatie

in de muis, en daarmee de kans op kortdurend ernstig ongerief. Dit zal tot een minimum beperkt worden door verhoogde observatiefrequentie wanneer dit noodzakelijk wordt geacht. Het maximale cumulatief ongerief wordt daarom ingeschaald als 'ernstig'.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De dieren kunnen na een infectie met MERS-CoV (BSL-3) niet voor andere doeleinden gebruikt worden: SARS- en MERS-CoV zijn beide geclassificeerd als BSL-3, voor nieuw geïsoleerde virusstammen in uitbraaksituaties is de verwachting dat ook deze als zodanig geclassificeerd zullen worden. Daarnaast zal de virale load en (histo)pathologische afwijkingen in longmateriaal en ander respiratoire weefsels bepaald worden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u 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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef                             |
|------------|--|
| 3          | Module 3: Time-course coronavirusinfecties |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

De experimenten in dit deel van het projectvoorstel zijn opgezet om de eindpunten van coronavirusinfecties te bepalen die gebruikt zullen worden in de werkzaamheidsstudies in Module 6. Nadat in Module 1 de optimale infectiedosis bepaald is zullen in deze Module op verschillende tijdstippen na infectie de virologische en (histo)logische uitleesparameters uitgelezen worden op grond waarvan de gewenste eindpunten in de uit te voeren werkzaamheidsstudies van antivirale preparaten tegen een specifiek coronavirus in Module 6 te bepalen.

De opgevoerde modellen (muis, hamster, fret, konijn, kat) zullen gebruikt worden in de volgende gevallen, dit keuzeproces is verduidelijkt in de flowchart (zie Appendix 1), in het bovenste deel:

Afhankelijk van de vooraf beschikbare informatie over het specifieke coronavirus en de uit te testen antivirale interventiestrategie zal een informed decision voor de keuze van het model gemaakt worden:

In het geval het om time-course bepalingen gaat van SARS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis, hamster, fret, kat.

In het geval het om time-course bepalingen gaat van MERS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis ( ), konijn ( )

In het geval het om time-course bepalingen gaat van nieuwe coronavirusvarianten (X-CoV) zal in potentie gebruikt gemaakt kunnen gaan worden van elk van de opgevoerde modellen. Middels (pilot) dose finding studies (module 1) zal het meest geschikte model geselecteerd worden, op basis van aantoonbare virusreplacatie in het betreffende model na infectie met deze nieuwe coronavirusvarianten.

De aanvrager voert deze studies uit als een zgn. CRO voor derden. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft

gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de asymptomatische MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Na een acclimatisatieperiode van minimaal een week zijn de handelingen met de dieren de volgende:

Voor of op dag 0: markeren ter identificatie, bloedafname onder adequate sedatie indien nodig, bemonsteren van de luchtweg middels een neus- en/of keelwab (referentiemonsters)

Dag 0: i.n. en/of i.t. infectie met een coronaviruspreparaat onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie; wegen

Dag 0-x: dagelijks wegen

Dag x: Euthanasie van individuele groepen op verschillende dagen na infectie, afhankelijk van de resultaten behaald in dose finding studies met het uit te testen viruspreparaat (Module 1). Respiratoire weefsels zullen worden geïsoleerd teneinde de uitleesparameters (virologie, (histo)pathologie, immunohistochemie) uit te kunnen lezen.

Voor de nu bekende coronavirussen is uiterlijk dag 7 het te verwachten eindpunt. Voor nieuwe virussen/stammen zou een later tijdstip wenselijk kunnen zijn. Indien dit het geval is wordt dit middels de werkprotocollen afgestemd met de IvD.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Per eindpunt/euthanasiemoment zullen voor de diersmodellen ■ dieren geïnfecteerd worden.

MERS-CoV is een betrekkelijk recent geïdentificeerd virus en de hoeveelheid beschikbare gegevens uit eigen studies en publicaties is daardoor beperkt. Eigen gegevens verkregen met een soortgelijk virus (SARS-CoV) en andere onderzoeken in diersmodellen voor respiratoire infecties zoals (bv. (hoog)pathogeen) influenzavirus) zijn meegenomen in de overwegingen voor het bepalen van de benodigde aantallen dieren. Indien uit voortschrijdend inzicht blijkt dat deze studies met minder dieren uitgevoerd kunnen worden zullen de bij de IvD in te dienen werkprotocollen daarop aangepast worden.

Voor time course studies worden ■ groepen per studie gebruikt: aan de hand van de beschikbare gegevens uit bv. dose-finding studies worden nl. 4 tijdstippen gekozen waarop de dieren zullen worden geëuthanaseerd teneinde de uitleesparameters op deze tijdstippen te bepalen.

Gebaseerd op het aantal studies dat verwacht wordt in de komende 5 jaar, is het maximum aantal dieren dat gebruikt zal worden over die periode uitgerekend. Het aantal dieren per groep, groepen per studie en het aantal te verwachten studies over de projectperiode levert de dieraantallen in de tabel op. Dit maximum is een schatting omdat aanvrager deze studies uitvoert als een zgn. CRO voor derden. Het exacte aantal benodigde dieren is afhankelijk van het aantal contracten dat in die periode zal worden afgesloten. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn.

De tabel hieronder geeft per fase het aantal benodigde dieren voor dit deel van het projectvoorstel weer.

Module 3	Diersoort	Groeps-grootte	Geschat aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar
TC	Muis	■	■	■	■
	Muis transgeen			■	■
	Fret			■	■
	Kat			■	■
	Hamster			■	■
	Konijn			■	■

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

De farmaceutische bedrijven/opdrachtgever van de aanvrager maken gebruik van de expertise van de aanvrager voor het bepalen van het relevante preklinische model om een specifiek preparaat uit te testen.

Voor het testen van antivirale preparaten gericht op de bestrijding van SARS-CoV zijn bij de aanvrager de volgende preklinische modellen beschikbaar: Fret, kat, hamster en muis.

Voor het testen van antivirale preparaten gericht op de bestrijding van MERS-CoV zijn bij de aanvrager de volgende preklinische modellen beschikbaar: Konijn en muis.

In het geval van een uitbraaksituatie met een nieuw coronavirus (X-CoV) zal middels beschikbare virologische, epidemiologische en klinische informatie, in vitro onderzoek maar eventueel ook middels (pilot) dose finding studies in Module 1 een geschikt preklinisch model voor dit nieuwe virus geselecteerd kunnen worden

Afhankelijk van het middel dat onderzocht gaat worden en de vraagstelling die de opdrachtgever(s) van de studies beantwoord wenst (wensen), zal een keuze voor één van de modellen gemaakt worden. De overwegingen die hierin een rol spelen (te onderzoeken agens, toedieningsroutes en volumes, gewenste uitleesparameters) zullen bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD onderbouwd worden.

Soort en levensstadia: afhankelijk van het gekozen coronavirus zal het meest relevante diermodel gekozen worden, waarbij vatbaarheid voor het gekozen coronavirus een belangrijke rol speelt. In huis gegenereerde en misschien niet publiekelijk resultaten, maar ook wetenschappelijke publicaties vormen de basis voor deze keuze. De verschillende leeftijden voor de verschillende modellen zijn hieronder weergegeven op basis van wetenschappelijke publicaties, maar kunnen bijgesteld worden indien additionele data beschikbaar zijn. Indien het laatste het geval is zullen deze data voorgelegd worden aan de IvD ter beoordeling.

Muizen ( $\geq 5$  wk: [redacted]), fretten ( $\geq 3$  mnd: [redacted]), katten ( $\geq 8$  wk: [redacted]), hamsters ( $\geq 5$  wk, [redacted]), konijnen ( $\geq 6$  mnd: [redacted]). Bij muizen kan gebruik gemaakt worden van transgene dieren die ofwel de receptor voor SARS-CoV ([redacted]), ofwel de receptor voor MERS-CoV ([redacted]) tot expressie brengen.

Herkomst: Geregistreerde fok/leverancier. In het geval van transgene muizen worden deze betrokken van de instellingen waarin deze gegenereerd zijn.

De keuze voor specifieke geslachten is gebaseerd op aanwezige dan wel gepubliceerde informatie – zie hieronder de onderbouwing per model.

- Hamster – vrouw ([redacted])
- Muis, wild type coronavirussen
  - Balb/c – vrouw ([redacted])
  - Tg – geen specificatie ([redacted])
- Muis, aangepaste coronavirussen
  - Balb/c – vrouw ([redacted])
- Konijn – vrouw ([redacted])
- Fret, man/vrouw – ([redacted])
- Kat, vrouw – ([redacted])

De keuze van het geslacht zal meegenomen in de aanvraag van de verschillende dierproeven die uitgevoerd zullen worden binnen dit project en deze keuze zal ook voorgelegd en beoordeeld worden door de IvD. Hierin zullen de onderstaande overwegingen meegenomen worden, niet gerangschikt op basis van prioriteit in de overweging:

- Beschikbaarheid van de dieren (van een bepaald geslacht);
- Eerder uitgevoerde experimenten (al dan niet uitgevoerd door de aanvrager of gecommuniceerd door de opdrachtgever aan de aanvrager) waarmee vergeleken dient te worden;
- Bepaalde keuze van geslacht vanuit wetenschappelijk of regelgevend oogpunt.

Bij het aanvragen van de verschillende dierproeven zal toezicht gehouden worden (door middel van toetsing van werkprotocollen inclusief de rechtvaardiging voor het geslacht bij IvD) over het gelijkwaardig gebruik van de verschillende geslachten tussen de dierproeven.

Los van bovenstaande argumenten willen wij nog toevoegen dat voor experimenten waarbij ook inperking een belangrijke factor is (BSL klasse II of III), er een logistiek probleem is in het uitvoeren van dierproeven met beide geslachten. Zoals in de bijlage benoemd zullen de experimenten onder zeer gecontroleerde omstandigheden uitgevoerd worden, waarbij bij experimenten met coronavirussen altijd gebruik gemaakt wordt voor de hoogst mogelijke inschaling BSL III (en dus isolator huisvesting) in verband met potentiële aerosol transmissie tussen groepen maar ook van dieren naar onderzoekers/biotechnici. Per isolator kan maar één sexe worden gehuisvest.

Geschatte aantallen, totaal per diersoort, zie de tabel in 2A voor de onderliggende berekening:

Muis: ■■

Muis (transgeen): ■■

Fret: ■■

Kat: ■■

Hamster: ■■

Konijn: ■■■

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Het bepalen van de optimale eindpunten voor gebruik in werkzaamheidsstudies (Module 6) kan enkel plaatsvinden in de in die module te gebruiken dieren. De virologische en (histo)pathologische parameters die hiervoor van belang zijn kunnen niet in proefdierlijke alternatieven gegenereerd worden.

Vermindering: Het ingeschatte aantal dieren is bepaald op de (soms) beperkte hoeveelheid informatie die voor de betreffende preklinische modellen beschikbaar is. Indien uit studies uit te voeren in het huidige project blijkt dat, bv. door beperkte spreiding in de uitkomsten, met minder dieren evengoed robuuste resultaten te behalen zijn zal dit voortschrijdende inzicht gebruikt worden voor het opstellen van werkprotocollen waarin deze vermindering concreet gemaakt wordt.

Verfijning: De gekozen modellen zijn de enige tot dusver beschikbare modellen voor de beschreven coronavirusinfecties. Bij de keuze van het te gebruiken model voor een specifieke studie zal een nauwkeurige afweging gemaakt worden op basis van het te testen preparaat en de bijbehorende achtergrondinformatie, het beoogde virale agens (SARS-, MERS- of een nog onbekend coronavirus: X-CoV) en de gewenste uitleesparameters. Deze overwegingen zullen overlegt worden aan de IvD bij het indienen van de werkprotocollen voor uitvoering van de studies in het kader van dit project.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

De infectieprocedures worden onder voor de diersoort adequate sedatie uitgevoerd. De dieren worden dagelijks verzorgd en geobserveerd om de gezondheidsstatus bij te houden en hun welzijn te garanderen. Er zijn humane eindpunten gedefinieerd om onnodig ernstig ongerief te voorkomen (zie J.). Nadelige milieueffecten worden tot een minimum beperkt doordat gewerkt wordt onder DM-III omstandigheden in faciliteiten waarvoor destructie- en afvoerprocedures voor afval vastgelegd zijn.



## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Intratracheale infectieprocedures zullen worden uitgevoerd onder voor de diersoort en behandeling adequate anesthesie.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Afhankelijk van de virulentie van de gebruikte virusstam en de proefdiersoort kan er in meer dan wel mindere mate sprake zijn van klinische symptomen als gevolg van de coronavirusinfectie. De klinische symptomen die voor de preklinische modellen die in dit projectvoorstel gebruikte worden zijn met name respiratoir van aard: deze kenmerken zich door een verhoogde ademhalingsfrequentie tot moeizaam ademen waarbij de flanken zichtbaar overdreven ingetrokken worden, de dieren gestrekt gaan liggen (teneinde de luchtwegen zoveel mogelijk toegankelijk te houden) en lethargisch zijn en/of een stukkende

ademhaling (dyspneu). Zie ook humane eindpunten bij sectie J.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak is de coronavirusinfectie.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Tweemaal daags observatie van de dieren vanaf infectie. De observatiefrequentie zal verhoogd worden indien nodig, mochten observaties daartoe aanleiding geven. Er zijn humane eindpunten gedefinieerd, zie J.

## **J. Humane eindpunten**

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Infecties met coronavirussen kunnen, afhankelijk van het model, leiden tot een ziektebeeld dat gekenmerkt wordt door respiratoire problemen, dyspneu (zie voor omschrijving hiervan de humane eindpunten hieronder), afwezigheid van eetlust, lethargie en gewichtsverlies. Na infectie zullen de dieren uitvoerig gevolgd worden voor het detecteren van deze verschijnselen.

De dieren worden geëuthanaseerd als zich één of enkele van de volgende omstandigheden zich voor doen:

1. Het dier eet of drinkt niet meer
2. Afname lichaamsgewicht (de dieren worden na infectie dagelijks gewogen):
  - a. > 15% in 2 dagen
  - b. > 20% t.o.v. aanvangsgewicht
3. Er kan sprake zijn van matig-ernstige ademhalingsproblemen als gevolg van de coronavirusinfectie: deze kenmerken zich door een verhoogde ademhalingsfrequentie (matig ongerief, geen humaan eindpunt) tot moeizaam ademen waarbij de flanken zichtbaar overdreven ingetrokken worden, de dieren gestrekt gaan liggen (teneinde de luchtwegen zoveel mogelijk toegankelijk te houden) en lethargisch zijn (deze combinatie wordt ingeschaald als ernstig ongerief) of een stokkende ademhaling (dyspneu) (beide zijn humane eindpunten).

De beschreven HEP's zijn algemeen van toepassing op infecties met virussen die impact hebben op het respiratoire systeem van de verschillende diermodellen, zoals voor de bekende SARS/MERS modellen. De aanname dat deze HEP's ook op infecties met nieuwe coronavirusvarianten in deze modellen van toepassing zijn is dan ook reëel. Er is uitgebreide ervaring bij het personeel van de aanvrager in studies met respiratoire infecties en de toepassing van de bijbehorende HEP's waardoor toepassing ervan bij nieuwe virusvarianten nauwgezet plaats zal kunnen vinden.

De virusreplikatiekinetiek in de beschreven modellen verloopt doorgaans binnen een periode van 7 dagen, zowel voor asymptomatische modellen als voor modellen waarbij klinische verschijnselen optreden: voor SARS infecties bij fretten en in ACE2 muizen zijn 2 – 5 dagen na infectie HEP te verwachten.

Humane eindpunten die zich sporadisch kunnen voordoen in dierstudies in het algemeen zijn:

4. Het dier vertoont onbehandelbare wonden door bv. vechten of op andere wijze opgelopen.
5. Het dier vertoont een matig-ernstig afwijkend gedrags- en voortbewegingspatroon.

De dieren worden na de infectie tweemaal daags bekeken voor klinische symptomen. De observatiefrequentie zal verhoogd worden indien nodig, mochten observaties daartoe aanleiding geven. Hierop zal bij ieder individueel experiment toegezien worden – het verloop van (pilot) dose finding studies in module 1 en de time-course studies in deze module zal in het geval van onbekende coronavirus preparaten (nieuwe varianten, batches, combinaties) veel gerichte data/informatie opleveren om de observatiefrequentie indien nodig te kunnen specificeren voor de studies in de overige modules. Er zijn vooralsnog geen andere symptomen te verwachten.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Gepubliceerde coronavirusinfecties in katten, hamsters en konijnen verlopen zonder klinische verschijnselen. In fretten is bij SARS-CoV infecties in 50% van de dieren lethargie gerapporteerd (■■■■■■■■■■). In jonge inteeltmuizen verloopt de SARS-CoV infectie eveneens asymptomatisch. In oude (12 mnd) Balb/c muizen zijn klinische verschijnselen als opstaande haren, gewichtsverlies (< 10%) en lichte dehydratie gerapporteerd (■■■■■■■■■■). In huDPP4 knock-in muizen die voor MERS-CoV infecties gebruikt worden verloopt de infectie zonder manifestatie van klinische verschijnselen (■■■■■■■■■■). Samenvattend lijkt de kans op het bereiken van de humane eindpunten in deze modellen zeer klein (<5%). In ACE2 transgene muizen geïnfecteerd met SARS-CoV zijn klinische verschijnselen als >20% gewichtsverlies en mortaliteit gerapporteerd (■■■■■■■■■■), afhankelijk van de infectiedosis. Ook in het geval dat aan de muis geadapteerde virusstammen afkomstig uit Module 2 gebruikt worden is het gezien eerdere publicaties van soortgelijke experimenten met SARS-CoV aannemelijk dat afhankelijk van de dosering >20% gewichtsverlies binnen 3-5 dagen kan optreden. Om de eindpunten van infectie te kunnen bepalen zal voor deze modellen een infectiedosis gekozen worden op basis van de resultaten in Module 1 die garandeert dat de eindpunten bepaald kunnen worden. De kans op het optreden van de algemene humane eindpunten (4 en 5) wordt zeer klein geacht,  $\leq 1\%$ .

#### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Coronavirusinfecties in katten, hamsters en konijnen en in enkele Balb/c muizenmodellen verlopen zonder klinische verschijnselen. Het maximale cumulatieve ongerief in deze modellen is dan ook ingeschaald als licht.

De beschreven HEP's voor modellen met klinische verschijnselen verminderen het optreden van ernstig ongerief, maar 100% garantie op het voorkomen ervan is niet af te geven. Kortdurend ernstig ongerief in modellen met klinische symptomen (fretten, ACE2 Tg muizen, Balb/c muizen in enkele modellen) is dan ook niet uit te sluiten maar dit zal tot een minimum beperkt worden door verhoogde observatiefrequentie wanneer dit noodzakelijk wordt geacht. Voor deze modellen kan voor een deel van de dieren (zie ook J) het maximale cumulatieve ongerief dan ook als ernstig worden ingeschaald. De beschreven HEP's zijn van toepassing op infecties met virussen die impact hebben op het respiratoire systeem van de verschillende diermodellen, zoals voor de bekende SARS/MERS modellen, maar ook voor bv. infectiemodellen voor hoogpathogene influenzavirussen. Met al deze modellen heeft de aanvrager veel ervaring, waardoor nauwkeurige ongeriefinschatting en bepaling van het bereiken van HEPs in de experimenten gewaarborgd.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De dieren kunnen na een infectie met MERS-CoV (BSL-3) niet voor andere doeleinden gebruikt worden: SARS- en MERS-CoV zijn beide geclassificeerd als BSL-3, voor nieuw geïsoleerde virusstammen in uitbraaksituaties is de verwachting dat ook deze als zodanig geclassificeerd zullen worden. Daarnaast zal de virale load en (histo)pathologische afwijkingen in longmateriaal en ander respiratoire weefsels bepaald worden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u 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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef                                    |
|------------|---|
| 4          | Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

De experimenten in dit deel van het projectvoorstel zijn opgezet om de farmacokinetiek van antivirale formuleringen/preparaten te bepalen. De resultaten van deze experimenten kunnen gebruikt worden om de opzet voor studies naar de werkzaamheid van deze preparaten te maken die in Module 6 beschreven wordt, waarin de effectiviteit van behandelingsmethoden tegen coronavirusinfecties wordt bepaald.

De opgevoerde modellen (muis, hamster, fret, konijn, kat) zullen gebruikt worden in de volgende gevallen, dit keuzeprocess is verduidelijkt in de flowchart (zie Appendix 1), in het bovenste deel:

Afhankelijk van de vooraf beschikbare informatie over het specifieke coronavirus en de uit te testen antivirale interventiestrategie zal een informed decision voor de keuze van het model gemaakt worden:

In het geval het om farmacokinetiek studies gaat van antivirale middelen/preparaten tegen SARS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis, hamster, fret, kat.

In het geval het om farmacokinetiek studies gaat van antivirale middelen/preparaten tegen MERS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis ( ), konijn ( ).

In het geval het om farmacokinetiek studies gaat van antivirale middelen/preparaten tegen nieuwe coronavirusvarianten (X-CoV) zal in potentie gebruikt gemaakt kunnen gaan worden van elk van de opgevoerde modellen. Middels (pilot) dose finding studies beschreven in module 1 zal het meest geschikte model geselecteerd worden, op basis van aantoonbare virusreplacatie in het betreffende model na infectie met deze nieuwe coronavirusvarianten.

De aanvrager voert deze studies uit als een zgn. CRO voor derden. Omdat het voorspellen van uitbraken

onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de asymptomatische MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn. De primaire uitleesparameter hangt af van het preparaat dat getest wordt en kan variëren van virus specifieke antilichaamtiteren in serum wanneer het antilichaampreparaten betreft of serum concentraties wanneer het gaat om antivirale formuleringen.

---

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

---

Om de farmacokinetiek van antivirale preparaten (compounds, antilichaampreparaten) te meten die bepaald hoe dosering en toedieningsfrequentie van deze farmaca voor werkzaamheidsstudies in Module 6 zullen zijn, wordt de volgende experimentele opzet als leidraad gehanteerd:

Een maximale looptijd van 14 dagen na eerste toediening wordt aangehouden. Voor farmaca zal deze periode doorgaans korter zijn, voor antilichaampreparaten zal maximaal deze looptijd worden aangehouden. Na een acclimatisatieperiode van minimaal een week zijn de handelingen met de dieren de volgende: Voor of op dag 0: markeren ter identificatie, bloedafname onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig (referentiemonster)

Dag 0: toediening van antivirale preparaten (intraveneus, intramusculair, intranasaal, intraperitoneaal of subcutaan, afhankelijk van het uit te testen preparaat) onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie.

Dag 0 – 14: bloedafnames onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig, de frequentie hiervan is afhankelijk van het uit te testen preparaat (maximaal 2 x daags, tevens afhankelijk van het diermodel). Afhankelijk van het preparaat en de beschikbare informatie kunnen extra toedieningsmomenten in deze periode nodig zijn (maximaal 3 x daags, tevens afhankelijk van het diermodel), bv. wanneer er aanwijzingen zijn dat de halfwaardetijd van het preparaat in het dier onder een bepaalde tijd ligt waardoor extra toedieningsmomenten vereist zijn om een minimaal vereiste concentratie te kunnen garanderen. Toedienings-, afnamevolumes en frequentie zullen volgens richtlijnen beschreven in [REDACTED] plaatsvinden.

Dag 14: euthanasie onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig.

---

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

---

Omdat de meeste formuleringen voor het eerst getest zullen worden in nieuw ontwikkelde toedieningsschema's, is op voorhand geen alomvattende power analyse uit te voeren om de groepsgrootte van de controle- en behandelingsgroepen te bepalen. Data gegenereerd in deze studies zullen gebruikt worden voor power analyses van toekomstige studies. Daarnaast is er sprake van een grote verscheidenheid aan uitleesparameters (o.a. eiwit- dan wel compoundconcentraties in serum, ELISA waarden, virus neutraliserende antilichaamtiteren, etc., afhankelijk van het uit te testen preparaat) die allen een eigen resolutie hebben. Bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD zullen indien voorhanden specifieke power analyses aangeleverd worden voor individuele studies. Het *maximum* aantal dieren per groep wordt op voorhand ingeschat op [REDACTED] voor de muizenmodellen en [REDACTED] voor de overige modellen, op basis van eerdere studies met antivirale preparaten.

Voor studies ter bepaling van de farmacokinetiek van antivirale middelen worden maximaal [REDACTED] groepen per studie gebruikt: aan de hand van beschikbare gegevens van het preparaat of vergelijkbare preparaten in soortgelijke modellen zullen een aantal doseringsschema's opgesteld worden. De doseringsschema's van de verschillende groepen kunnen bestaan uit meerdere toedieningsmomenten in verschillende tijdsintervallen, verschillende concentraties van het uit te testen preparaat of een combinatie daarvan.

Gebaseerd op het aantal studies dat verwacht wordt in de komende 5 jaar, is het maximum aantal dieren dat gebruikt zal worden over die periode uitgerekend. Het aantal dieren per groep, groepen per studie en het aantal te verwachten studies over de projectperiode levert de dieraantallen in de tabel op. Dit maximum is een schatting omdat aanvrager deze studies uitvoert als een zgn. CRO voor derden. Het exacte aantal benodigde dieren is afhankelijk van het aantal contracten dat in die periode zal worden afgesloten. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat

---

zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn.

De tabel hieronder geeft het aantal benodigde dieren voor dit deel van het projectvoorstel weer.

Module 4	Diersoort	Groeps-grootte	Geschat aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar
PK	Muis	■	■	■	■
	Muis transgeen	■		■	■
	Fret	■		■	■
	Kat	■		■	■
	Hamster	■		■	■
	Konijn	■		■	■

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

De farmaceutische bedrijven/opdrachtgever van de aanvrager maken gebruik van de expertise van de aanvrager voor het bepalen van het relevante preklinische model om een specifiek preparaat uit te testen.

Voor het testen van antivirale preparaten gericht op de bestrijding van SARS-CoV zijn bij de aanvrager de volgende preklinische modellen beschikbaar: Fret, kat, hamster en muis.

Voor het testen van antivirale preparaten gericht op de bestrijding van MERS-CoV zijn bij de aanvrager de volgende preklinische modellen beschikbaar: Konijn en muis.

In het geval van een uitbraaksituatie met een nieuw coronavirus (X-CoV) zal middels beschikbare virologische, epidemiologische en klinische informatie, in vitro onderzoek maar eventueel ook middels (pilot) dose finding studies in Module 1 een geschikt preklinisch model voor dit nieuwe virus geselecteerd kunnen worden

Afhankelijk van het middel dat onderzocht gaat worden en de vraagstelling die de opdrachtgever(s) van de studies beantwoord wenst (wensen), zal een keuze voor één van de modellen gemaakt worden. De overwegingen die hierin een rol spelen (te onderzoeken agens, toedieningsroutes en volumes, gewenste uitleesparameters) zullen bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD onderbouwd worden.

Soort en levensstadia: afhankelijk van het gekozen coronavirus zal het meest relevante diermodel gekozen worden, waarbij vatbaarheid voor het gekozen coronavirus een belangrijke rol speelt. In huis gegenereerde en misschien niet publiekelijke resultaten, maar ook wetenschappelijke publicaties vormen de basis voor deze keuze. De verschillende leeftijden voor de verschillende modellen zijn hieronder weergegeven op basis van wetenschappelijke publicaties, maar kunnen bijgesteld worden indien additionele data beschikbaar zijn. Indien het laatste het geval is zullen deze data voorgelegd worden aan de IvD ter beoordeling.

Muizen ( $\geq 5$  wk: [redacted]), katten ( $\geq 8$  wk: [redacted]), fretten ( $\geq 3$  mnd: [redacted]), hamsters ( $\geq 5$  wk, [redacted]), konijnen ( $\geq 6$  mnd: [redacted]). Bij muizen kan gebruik gemaakt worden van transgene dieren die ofwel de receptor voor SARS-CoV ([redacted]), ofwel de receptor voor MERS-CoV ([redacted]) tot expressie brengen.

Herkomst: Geregistreerde fok/leverancier. In het geval van transgene muizen worden deze betrokken van de instellingen waarin deze gegenereerd zijn.

De keuze voor specifieke geslachten is gebaseerd op aanwezige dan wel gepubliceerde informatie – zie hieronder de onderbouwing per model.

- Hamster – vrouw ([redacted])
- Muis, wild type coronavirussen
  - Balb/c – vrouw ([redacted])
  - Tg – geen specificatie ([redacted])

- Muis, aangepaste coronavirussen
  - Balb/c – vrouw ( )
- Konijn – vrouw ( )
- Fret, man/vrouw – ( )
- Kat, vrouw – ( )

De keuze van het geslacht zal meegenomen in de aanvraag van de verschillende dierproeven die uitgevoerd zullen worden binnen dit project en deze keuze zal ook voorgelegd en beoordeeld worden door de IvD. Hierin zullen de onderstaande overwegingen meegenomen worden, niet gerangschikt op basis van prioriteit in de overweging:

- Beschikbaarheid van de dieren (van een bepaald geslacht);
- Eerder uitgevoerde experimenten (al dan niet uitgevoerd door de aanvrager of gecommuniceerd door de opdrachtgever aan de aanvrager) waarmee vergeleken dient te worden;
- Bepaalde keuze van geslacht vanuit wetenschappelijk of regelgevend oogpunt.

Bij het aanvragen van de verschillende dierproeven zal toezicht gehouden worden (door middel van toetsing van werkprotocollen inclusief de rechtvaardiging voor het geslacht bij IvD) over het gelijkwaardig gebruik van de verschillende geslachten tussen de dierproeven.

Los van bovenstaande argumenten willen wij nog toevoegen dat voor werkzaamheidsexperimenten uit te voeren in Module 6 waarbij ook inperking een belangrijke factor is (BSL klasse II of III), er een logistiek probleem is in het uitvoeren van dierproeven met beide geslachten. Zoals in de bijlage benoemd zullen de experimenten onder zeer gecontroleerde omstandigheden uitgevoerd worden, waarbij bij experimenten met coronavirussen altijd gebruik gemaakt wordt voor de hoogst mogelijke inschaling BSL III (en dus isolator huisvesting) in verband met potentiële aerosol transmissie tussen groepen maar ook van dieren naar onderzoekers/biotechnici. Per isolator kan maar één sexe worden gehuisvest. Het ontwerp van de experimenten uit te voeren in module 6 speelt dan ook een belangrijke rol in de geslachtskeuze voor de experimenten in deze module.

Geschatte aantallen, totaal per diersoort, zie de tabel in 2A voor de onderliggende berekening:

Muis:

Muis (transgeen):

Fret:

Kat:

Hamster:

Konijn:

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Het bepalen van het optimale toedieningsschema van antivirale middelen tegen coronavirusinfecties voor gebruik in werkzaamheidsstudies (Module 6) kan enkel plaatsvinden in de in die module te gebruiken dieren. De parameters (o.a. eiwit- dan wel compoundconcentraties in serum, ELISA waarden, virus neutraliserende antilichaamtiter, etc., afhankelijk van het uit te testen preparaat) die hiervoor van belang zijn kunnen niet in proefdiervrije alternatieven gegenereerd worden.

Vermindering: Welke middelen uitgetest zullen worden is nog onbekend, want afhankelijk van het product dat de opdrachtgevers willen laten testen in de preklinische modellen van de aanvrager. Indien uit studies uit te voeren in het huidige project blijkt dat, bv. door beperkte spreiding in de uitkomsten, met minder dieren evengoed robuuste resultaten te behalen zijn zal dit voortschrijdende inzicht gebruikt worden voor het opstellen van werkprotocollen voor dit project waarin deze vermindering concreet gemaakt wordt. De resultaten verkregen in de studies in deze Module vormen de basis voor een go/no-go moment: indien uit de farmacokinetiek van de gebruikte preparaten blijkt dat de biologische beschikbaarheid in het gebruikte preklinische model onvoldoende is zal op basis van deze studies geen werkzaamheidsstudie in dat model plaatsvinden.

Verfijning: De gekozen modellen zijn de enige tot dusver beschikbare modellen voor de beschreven coronavirusinfecties die gebruikt worden in de werkzaamheidsstudies in Module 6. Bij de keuze van het te gebruiken model voor een specifieke studie zal een nauwkeurige afweging gemaakt worden op basis van het te testen preparaat en de bijbehorende achtergrondinformatie, het beoogde virale agens (SARS-, MERS- of een nog onbekend coronavirus: X-CoV) en de gewenste uitleesparameters. Deze overwegingen zullen overlegt worden aan de IvD bij het indienen van de werkprotocollen voor uitvoering van de studies in het kader van dit project.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Toedienings- en afnameprocedures zullen waar nodig onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie plaatsvinden. De dieren worden dagelijks verzorgd en geobserveerd om de gezondheidsstatus bij te houden en hun welzijn te garanderen.

Nadelige milieueffecten worden tot een minimum beperkt doordat gewerkt wordt onder DM-II omstandigheden in faciliteiten waarvoor destructie- en afvoerprocedures voor afval vastgelegd zijn.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?



---

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Toedienings- en afnameprocedures zullen indien nodig onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie plaatsvinden.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

### J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Humane eindpunten die zich sporadisch kunnen voordoen in dierstudies in het algemeen zijn:

1. Het dier vertoont onbehandelbare wonden door bv. vechten of op andere wijze opgelopen.
2. Het dier vertoont een matig-ernstig afwijkend gedrags- en voortbewegingspatroon.

Voor farmacokinetiekstudies van antivirale middelen/compounds zijn geen andere HEP's van toepassing. Toediening van compounds/preparaten leidt niet tot situaties waarbij specifieke HEP's optreden, dit is in geen enkele dierstudie van de aanvrager in het verleden geobserveerd. Desalniettemin zal vooraf bij opdrachtgever(s)/leveranciers van de uit te testen preparaten informatie opgevraagd worden of er bijwerkingen te verwachten zijn, indien nodig worden specifieke HEP's opgenomen in de werkprotocollen voor overleg met de IvD.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

De kans hierop wordt zeer klein geacht,  $\leq 1\%$ .

### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd als licht tot matig, afhankelijk van de frequentie van toedienings- en afnameprocedures.

**Einde experiment**

**L. Wijze van doden**

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De dieren zullen worden geëuthanaseerd om bloed en eventueel organen te verzamelen voor analyse.  
Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u 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.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		5	Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

De experimenten in dit deel van het projectvoorstel zijn opgezet om de immunogeniciteit van coronavirus-specifieke vaccinpreparaten te bepalen. Hiertoe worden de dieren volgens verschillende schema's geïmmuniseerd met de (kandidaat) vaccinpreparaten waarna de immuunrespons op gezette tijden ná immunisatie bepaald wordt aan de hand van geïnduceerde effectoren in het serum. De resultaten van deze experimenten zullen gebruikt worden om de vaccinatieschema's op te zetten waarmee de werkzaamheid van de vaccinpreparaten bepaald kan worden in de studies beschreven in Module 6. De opgevoerde modellen (muis, hamster, fret, konijn, kat) zullen gebruikt worden in de volgende gevallen, dit keuzeprocess is verduidelijkt in de flowchart (zie Appendix 1), in het bovenste deel:

Afhankelijk van de vooraf beschikbare informatie over het specifieke coronavirus en de uit te testen antivirale interventiestrategie zal een informed decision voor de keuze van het model gemaakt worden:

In het geval het om immunogeniciteitsstudies gaat van vaccinpreparaten tegen SARS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis, hamster, fret, kat.

In het geval het om immunogeniciteitsstudies gaat van vaccinpreparaten tegen MERS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis ( ), konijn ( ).

In het geval het om immunogeniciteitsstudies gaat van vaccinpreparaten tegen nieuwe coronavirusvarianten (X-CoV) zal in potentie gebruikt gemaakt kunnen gaan worden van elk van de opgevoerde modellen. Middels (pilot) dose finding studies beschreven in module 1 zal het meest geschikte model geselecteerd worden, op basis van aantoonbare virusreproductie in het betreffende

model na infectie met deze nieuwe coronavirusvarianten.

De aanvrager voert deze studies uit als een zgn. CRO voor derden. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de asymptomatische MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn. De primaire uitleesparameters zijn antilichaamtiteren (bv. virus neutraliserende) in serum en/of cellulaire immuunresponsen in bloed.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Na een acclimatisatieperiode van minimaal een week zijn de handelingen met de dieren de volgende: Voor of op dag 0: markeren ter identificatie, bloedafname onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig (referentiemonster)

Dag 0: toediening van vaccinpreparaten (intraveneus, intramusculair, intranasaal, intraperitoneaal of subcutaan, afhankelijk van het uit te testen preparaat) onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig.

In het geval van een schema met meerdere vaccinaties zal de toediening van de vaccinpreparaten herhaald worden. Intervallen tussen vaccinaties kunnen variëren van dagen tot weken, afhankelijk van het uit te testen vaccinpreparaat. Om de opgewekte immuunresponsen te kunnen bepalen zullen na iedere vaccinatie bloedmonsters genomen worden onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig. De frequentie en timing hiervan kan variëren, afhankelijk van het uit te testen vaccinpreparaat. De maximale afnamefrequentie zal eens per week zijn. De looptijd van een immunogeniciteitsstudie kan variëren van weken tot maanden. Gedetailleerde toedienings- en afnameschema's zullen aangeleverd worden aan de IvD in de daarvoor opgestelde werkprotocollen. Toedienings-, afnamevolumes en frequentie zullen volgens richtlijnen beschreven in ( ) plaatsvinden.

Aan het einde van de studie zullen de dieren worden geëuthanaseerd.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Omdat de meeste formuleringen voor het eerst getest zullen worden in nieuw ontwikkelde toedieningsschema's, is op voorhand geen alomvattende power analyse uit te voeren om de groepsgrootte van de controle- en behandelingsgroepen te bepalen. Data gegenereerd in deze studies zullen gebruikt worden voor power analyses van toekomstige studies. Daarnaast is er sprake van een grote verscheidenheid aan uitleesparameters (o.a. ELISA waarden, virus neutraliserende antilichaamtiteren, immuunglobuline concentraties, etc., afhankelijk van het uit te testen preparaat) die allen een eigen resolutie hebben.

Bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD zullen indien voorhanden specifieke power analyses aangeleverd worden voor individuele studies. Het *maximum* aantal dieren per groep wordt op voorhand ingeschat op ■ voor de muismodellen en ■ voor de overige diersoorten, op basis van eerdere studies met vaccinformuleringen.

Voor studies ter bepaling van de immunogeniciteit van vaccins worden maximaal ■ groepen per studie gebruikt: aan de hand van beschikbare gegevens van het vaccin of vergelijkbare vaccins in soortgelijke modellen zullen een aantal doseringsschema's opgesteld worden. De doseringsschema's van de verschillende groepen kunnen bestaan uit meerdere toedieningsmomenten in verschillende tijdsintervallen, verschillende concentraties van het uit te testen vaccin, of een combinatie daarvan waarbij ook sprake kan zijn van combinaties van vaccinpreparaten.

Gebaseerd op het aantal studies dat verwacht wordt in de komende 5 jaar, is het maximum aantal dieren dat gebruikt zal worden over die periode uitgerekend. Het aantal dieren per groep, groepen per studie en het aantal te verwachten studies over de projectperiode levert de dieraantallen in de tabel op. Dit maximum is een schatting omdat aanvrager deze studies uitvoert als een zgn. CRO voor derden. Het exacte aantal benodigde dieren is afhankelijk van het aantal contracten dat in die periode zal worden afgesloten. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige

modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn.

De tabel hieronder geeft het geschatte aantal benodigde dieren voor dit deel van het projectvoorstel weer.

Module 5	Diersoort	Groeps-grootte	Geschat aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar
IMM	Muis	■	■	■	■
	Muis transgeen	■		■	■
	Fret	■		■	■
	Kat	■		■	■
	Hamster	■		■	■
	Konijn	■		■	■

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

De farmaceutische bedrijven/opdrachtgever van de aanvrager maken gebruik van de expertise van de aanvrager voor het bepalen van het relevante preklinische model om een specifiek preparaat uit te testen.

Voor het testen van antivirale preparaten gericht op de bestrijding van SARS-CoV zijn bij de aanvrager de volgende preklinische modellen beschikbaar: Fret, kat, hamster en muis.

Voor het testen van antivirale preparaten gericht op de bestrijding van MERS-CoV zijn bij de aanvrager de volgende preklinische modellen beschikbaar: Konijn en muis.

In het geval van een uitbraaksituatie met een nieuw coronavirus (X-CoV) zal middels beschikbare virologische, epidemiologische en klinische informatie, in vitro onderzoek maar eventueel ook middels (pilot) dose finding studies in Module 1 een geschikt preklinisch model voor dit nieuwe virus geselecteerd kunnen worden

Afhankelijk van het middel dat onderzocht gaat worden en de vraagstelling die de opdrachtgever(s) van de studies beantwoord wenst (wensen), zal een keuze voor één van de modellen gemaakt worden. De overwegingen die hierin een rol spelen (te onderzoeken agens, toedieningsroutes en volumes, gewenste uitleesparameters) zullen bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD onderbouwd worden.

Soort en levensstadia: afhankelijk van het gekozen coronavirus zal het meest relevante diemodel gekozen worden, waarbij vatbaarheid voor het gekozen coronavirus een belangrijke rol speelt. In huis gegenereerde en misschien niet publiekelijke resultaten, maar ook wetenschappelijke publicaties vormen de basis voor deze keuze. De verschillende leeftijden voor de verschillende modellen zijn hieronder weergegeven op basis van wetenschappelijke publicaties, maar kunnen bijgesteld worden indien additionele data beschikbaar zijn. Indien het laatste het geval is zullen deze data voorgelegd worden aan de IvD ter beoordeling.

Muizen ( $\geq 5$  wk: [redacted]), fretten ( $\geq 3$  mnd: [redacted]), katten ( $\geq 8$  wk: [redacted]), hamsters ( $\geq 5$  wk, [redacted]), konijnen ( $\geq 6$  mnd: [redacted]). Bij muizen kan gebruik gemaakt worden van transgene dieren die ofwel de receptor voor SARS-CoV ([redacted]), ofwel de receptor voor MERS-CoV ([redacted]) tot expressie brengen.

Herkomst: Geregistreerde fok/leverancier. In het geval van transgene muizen worden deze betrokken van de instellingen waarin deze gegenereerd zijn.

De keuze voor specifieke geslachten is gebaseerd op aanwezige dan wel gepubliceerde informatie – zie hieronder de onderbouwing per model.

- Hamster – vrouw ([redacted])
- Muis, wild type coronavirussen
  - Balb/c – vrouw ([redacted])
  - Tg – geen specificatie ([redacted])
- Muis, aangepaste coronavirussen
  - Balb/c – vrouw ([redacted])

- Konijn – vrouw ( ██████████ )
- Fret, man/vrouw – ( ██████████ )
- Kat, vrouw – ( ██████████ )

De keuze van het geslacht zal meegenomen in de aanvraag van de verschillende dierproeven die uitgevoerd zullen worden binnen dit project en deze keuze zal ook voorgelegd en beoordeeld worden door de IvD. Hierin zullen de onderstaande overwegingen meegenomen worden, niet gerangschikt op basis van prioriteit in de overweging:

- Beschikbaarheid van de dieren (van een bepaald geslacht);
- Eerder uitgevoerde experimenten (al dan niet uitgevoerd door de aanvrager of gecommuniceerd door de opdrachtgever aan de aanvrager) waarmee vergeleken dient te worden;
- Bepaalde keuze van geslacht vanuit wetenschappelijk of regelgevend oogpunt.

Bij het aanvragen van de verschillende dierproeven zal toezicht gehouden worden (door middel van toetsing van werkprotocollen inclusief de rechtvaardiging voor het geslacht bij IvD) over het gelijkwaardig gebruik van de verschillende geslachten tussen de dierproeven.

Los van bovenstaande argumenten willen wij nog toevoegen dat voor werkzaamheidsexperimenten uit te voeren in Module 6 waarbij ook inperking een belangrijke factor is (BSL klasse II of III), er een logistiek probleem is in het uitvoeren van dierproeven met beide geslachten. Zoals in de bijlage benoemd zullen de experimenten onder zeer gecontroleerde omstandigheden uitgevoerd worden, waarbij bij experimenten met coronavirussen altijd gebruik gemaakt wordt voor de hoogst mogelijke inschaling BSL III (en dus isolator huisvesting) in verband met potentiële aerosol transmissie tussen groepen maar ook van dieren naar onderzoekers/biotechnici. Per isolator kan maar één sexe worden gehuisvest. Het ontwerp van de experimenten uit te voeren in module 6 speelt dan ook een belangrijke rol in de geslachtskeuze voor de experimenten in deze module.

Geschatte aantallen, totaal per diersoort, zie de tabel in 2A voor de onderliggende berekening:

Muis (wildtype): ██████████

Muis (transgeen): ██████████

Fret: ██████████

Kat: ██████████

Hamster: ██████████

Konijn: ██████████

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Het bepalen van het optimale vaccinatieschema voor gebruik in werkzaamheidsstudies (Module 6) kan enkel plaatsvinden in de in die module te gebruiken dieren. De immunologische parameters die hiervoor van belang zijn kunnen niet in proefdiervrije alternatieven gegenereerd worden.

Vermindering: Indien uit studies uit te voeren in het huidige project blijkt dat, bv. door beperkte spreiding in de uitkomsten, met minder dieren evengoed robuuste resultaten te behalen zijn zal dit voortschrijdende inzicht gebruikt worden voor het opstellen van werkprotocollen voor dit project waarin deze vermindering

concreet gemaakt wordt. De resultaten verkregen in de studies in deze Module vormen de basis voor een go/no-go moment: indien de immunogeniciteit van de gebruikte preparaten onvoldoende is zal op basis van deze studies geen werkzaamheidsstudie plaatsvinden.

Verfijning: De gekozen modellen zijn de enige tot dusver beschikbare modellen voor de beschreven coronavirusinfecties die gebruikt worden in de werkzaamheidsstudies in Module 6. Bij de keuze van het te gebruiken model voor een specifieke studie zal een nauwkeurige afweging gemaakt worden op basis van het te testen preparaat en de bijbehorende achtergrondinformatie, het beoogde virale agens (SARS-, MERS- of een nog onbekend coronavirus: X-CoV) en de gewenste uitleesparameters. Deze overwegingen zullen overlegt worden aan de IvD bij het indienen van de werkprotocollen voor uitvoering van de studies in het kader van dit project.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Toedienings- en afnameprocedures zullen waar nodig onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie plaatsvinden. De dieren worden dagelijks verzorgd en geobserveerd om de gezondheidsstatus bij te houden en hun welzijn te garanderen.

Nadelige milieueffecten worden tot een minimum beperkt doordat gewerkt wordt onder DM-II omstandigheden in faciliteiten waarvoor destructie- en afvoerprocedures voor afval vastgelegd zijn.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Toedienings- en afnameprocedures zullen indien nodig onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie plaatsvinden.

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t. Van de immunogenen zelf zijn geen bijwerkingen te verwachten, de eventueel te gebruiken adjuvantia zijn reeds vrijgegeven voor gebruik in humane toepassingen. Nadelige effecten t.g.v. de toediening van de vaccins zijn dan ook niet te verwachten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

### **J. Humane eindpunten**

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Humane eindpunten die zich sporadisch kunnen voordoen in dierstudies in het algemeen zijn:

1. Het dier vertoont onbehandelbare wonden door bv. vechten of op andere wijze opgelopen.
2. Het dier vertoont een matig-ernstig afwijkend gedrags- en voortbewegingspatroon.

Voor immunogeniciteitsstudies zijn geen andere HEP's van toepassing. Toediening van vaccins/preparaten leidt niet tot situaties waarbij specifieke HEP's optreden, dit is in geen enkele dierstudie van de aanvrager in het verleden geobserveerd. Desalniettemin zal vooraf bij opdrachtgever(s)/leveranciers van de uit te testen preparaten informatie opgevraagd worden of er bijwerkingen te verwachten zijn, indien nodig worden specifieke HEP's opgenomen in de werkprotocollen voor overleg met de IvD.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

De kans hierop wordt zeer klein geacht,  $\leq 1\%$ .

### **K. Classificatie van ongerief**

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd als licht tot matig, afhankelijk van de frequentie van toedienings- en afnameprocedures.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.



De dieren zullen na afloop geëuthanaseerd worden om bloed en eventueel organen te verzamelen voor analysedoeleinden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u 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.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		6	Module 6: Werkzaamheid antivirale interventiestrategieën

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

De experimenten in dit deel van het projectvoorstel zijn opgezet om de werkzaamheid van antivirale preparaten en/of vaccins tegen (de gevolgen van) coronavirusinfecties te bepalen. Hiertoe worden dieren vóór (preventief) of ná (therapeutisch) intranasale infectie met een coronavirus behandeld met de uit te testen preparaten volgens een specifiek schema dat afhankelijk is van de aard van het uit te testen preparaat. In gevallen waarin virus stam, challenge dosering en/of eindpunt van de studie onbekend zijn zullen data voor de bepaling hiervan gegenereerd worden in Modules 1, 2 en/of 3. Behandelingsschema's van de uit te testen preparaten kunnen indien onbekend bepaald worden op grond van de resultaten behaald in experimenten beschreven in Modules 4 en/of 5. De opgevoerde modellen (muis, hamster, fret, konijn, kat) zullen gebruikt worden in de volgende gevallen, dit keuzeprocess is verduidelijkt in de flowchart (zie Appendix 1), in het bovenste deel:

Afhankelijk van de vooraf beschikbare informatie over het specifieke coronavirus en de uit te testen antivirale interventiestrategie zal een informed decision voor de keuze van het model gemaakt worden:

In het geval het om werkzaamheidsstudies gaat van antivirale interventiestrategieën tegen SARS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis, hamster, fret, kat.

In het geval het om werkzaamheidsstudies gaat van antivirale interventiestrategieën tegen MERS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis ( ), konijn ( ).

In het geval het om werkzaamheidsstudies gaat van antivirale interventiestrategieën tegen nieuwe coronavirusvarianten (X-CoV) zal in potentie gebruikt gemaakt kunnen gaan worden van elk van de

opgevoerde modellen. Middels (pilot) dose finding studies beschreven in module 1 zal het meest geschikte model geselecteerd worden, op basis van aantoonbare virusreproductie in het betreffende model na infectie met deze nieuwe coronavirusvarianten.

De aanvrager voert deze studies uit als een zgn. CRO voor derden. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de asymptomatische MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn. De primaire uitleesparameters zijn virus loads in respiratoire monsters en histopathologie op respiratoire weefsels. De werkzaamheid van de uit te testen preparaten wordt bepaald door de mate waarin bovenstaande parameters zijn gereduceerd in behandelde vs. controle groepen.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Bepalen van de werkzaamheid van een therapeutisch preparaat:

Voor of op dag 0: markeren ter identificatie, bloedafname onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig (referentiemonster)

Dag 0: wegen, bloedafname onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig. Infectie met coronavirus, i.n. en/of i.t. afhankelijk van model en evt. gegevens verkregen uit studies beschreven in Module 1.

Dag 0 – x: Dagelijks wegen, afname van neus- en of keelwabs onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig, observatie van evt. klinische verschijnselen. Afhankelijk van het te testen preparaat, zullen één of meerdere toedieningsmomenten na infectie plaatsvinden via i.v., i.m., i.n., i.p. of s.c. routes. De intervallen kunnen variëren van uren tot dagen en worden mede bepaald door beschikbare farmacokinetische gegevens, evt. gegenereerd in Module 4 van het projectvoorstel. Deze informatie zal met de IvD gedeeld worden bij het indienen van de werkprotocollen. De dieren zullen worden geëuthanaseerd op het eindpunten die bepaald zijn in studies als beschreven in Modules 1 en 3.

Bepaling van de werkzaamheid van een profylactisch preparaat of vaccin:

Voor of op dag 0: markeren ter identificatie, bloedafname onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig (referentiemonster)

Afhankelijk van het uit te testen preparaat/preparaten zijn één of meerdere toedieningsmomenten nodig, de informatie hiervoor kan afkomstig zijn uit Modules 4 en/of 5 van dit projectvoorstel. Toedieningsroutes kunnen i.v., i.m., i.n., i.p. of s.c. zijn. In het geval van meerdere toedieningen kunnen de intervallen variëren van uren tot maanden. Om in het geval van vaccins de opgewekte immunoresponsen te kunnen bepalen zullen na iedere vaccinatie bloedmonsters genomen worden onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig. De frequentie en timing hiervan kan variëren, afhankelijk van het uit te testen vaccinpreparaat. De maximale afnamefrequentie zal eens per week zijn. Gedetailleerde informatie zal met de IvD gedeeld worden bij het indienen van de werkprotocollen.

Na voltooiing van het toedieningsschema zullen de dieren op een bepaald moment geïnfecteerd worden via de i.n. en/of de i.t. route. Op deze dag zal voor de infectieprocedure tevens een bloedafname plaatsvinden. Procedures vinden indien nodig plaats onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie.

Infectiedosis en route kunnen bepaald worden op gegevens beschikbaar uit eerdere studies zoals die beschreven in Module 1.

Na infectie: dagelijks wegen, zullen de dieren dagelijks: gewogen, afname van neus- en of keelwabs onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig, observatie van evt. klinische verschijnselen.

De dieren zullen worden geëuthanaseerd op het eindpunten die bepaald zijn in studies als beschreven in Modules 1 en 3.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Op basis van eerder verkregen data (niet gepubliceerd) met MERS-CoV en het vergelijkbare SARS-CoV is gebleken dat groepen van ■ dieren noodzakelijk zijn om statistisch significante data te verkrijgen. Een poweranalyse ( $\alpha = 0.05$  en power van 80) is uitgevoerd uitgaande van minimaal een 1  $\log_{10}$  verandering van de virale load bij een berekende standaard deviatie van maximaal 0.6. Hierbij komen we uit op een aantal van ■ dieren per groep.

Voor studies ter bepaling van de werkzaamheid van antivirale middelen of vaccins worden maximaal 10 groepen per studie gebruikt: aan de hand van beschikbare gegevens van de preparaten (bv. verkregen uit studies uitgevoerd in Module 4 of 5) of vergelijkbare preparaten in soortgelijke modellen zullen een aantal doseringsschema's opgesteld worden. De doseringsschema's van de verschillende groepen kunnen bestaan uit meerdere toedieningsmomenten in verschillende tijdsintervallen, verschillende concentraties van het uit te testen preparaat, of een combinatie daarvan waarbij ook sprake kan zijn van combinaties van vaccinpreparaten.

Gebaseerd op het aantal studies dat verwacht wordt in de komende 5 jaar, is het maximum aantal dieren dat gebruikt zal worden over die periode uitgerekend. Het aantal dieren per groep, groepen per studie en het aantal te verwachten studies over de projectperiode levert de dieren aantallen in de tabel op. Dit maximum is een schatting omdat aanvrager deze studies uitvoert als een zgn. CRO voor derden. Het exacte aantal benodigde dieren is afhankelijk van het aantal contracten dat in die periode zal worden afgesloten. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn.

De tabel hieronder geeft het geschatte aantal benodigde dieren voor dit deel van het projectvoorstel weer.

Module 6	Diersoort	Groeps-grootte	Geschat aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar
EFF	Muis	10	10	1	10
	Muis transgeen			1	10
	Fret			1	10
	Kat			1	10
	Hamster			1	10
	Konijn			1	10

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes.

De farmaceutische bedrijven/opdrachtgever van de aanvrager maken gebruik van de expertise van de aanvrager voor het bepalen van het relevante preklinische model om een specifiek preparaat uit te testen.

Voor het testen van antivirale preparaten gericht op de bestrijding van SARS-CoV zijn bij de aanvrager de volgende preklinische modellen beschikbaar: Fret, kat, hamster en muis.

Voor het testen van antivirale preparaten gericht op de bestrijding van MERS-CoV zijn bij de aanvrager de volgende preklinische modellen beschikbaar: Konijn en muis.

In het geval van een uitbraaksituatie met een nieuw coronavirus (X-CoV) zal middels beschikbare virologische, epidemiologische en klinische informatie, in vitro onderzoek maar eventueel ook middels (pilot) dose finding studies in Module 1 een geschikt preklinisch model voor dit nieuwe virus geselecteerd kunnen worden

Afhankelijk van het middel dat onderzocht gaat worden en de vraagstelling die de opdrachtgever(s) van de studies beantwoord wenst (wensen), zal een keuze voor één van de modellen gemaakt worden. De overwegingen die hierin een rol spelen (te onderzoeken agens, toedieningsroutes en volumes, gewenste uitleesparameters) zullen bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD onderbouwd worden.

Soort en levensstadia: afhankelijk van het gekozen coronavirus zal het meest relevante diermodel gekozen worden, waarbij vatbaarheid voor het gekozen coronavirus een belangrijke rol speelt. In huis gegenereerde en misschien niet publiekelijke resultaten, maar ook wetenschappelijke publicaties vormen de basis voor deze keuze. De verschillende leeftijden voor de verschillende modellen zijn hieronder weergegeven op basis

van wetenschappelijke publicaties, maar kunnen bijgesteld worden indien additionele data beschikbaar zijn. Indien het laatste het geval is zullen deze data voorgelegd worden aan de IvD ter beoordeling.

Muizen ( $\geq 5$  wk: [redacted]), fretten ( $\geq 3$  mnd: [redacted]), katten ( $\geq 8$  wk: [redacted]), hamsters ( $\geq 5$  wk, [redacted]), konijnen ( $\geq 6$  mnd: [redacted]). Bij muizen kan gebruik gemaakt worden van transgene dieren die ofwel de receptor voor SARS-CoV ([redacted]), ofwel de receptor voor MERS-CoV ([redacted]) tot expressie brengen.

Herkomst: Geregistreerde fok/leverancier. In het geval van transgene muizen worden deze betrokken van de instellingen waarin deze gegenereerd zijn.

De keuze voor specifieke geslachten is gebaseerd op aanwezige dan wel gepubliceerde informatie – zie hieronder de onderbouwing per model.

- Hamster – vrouw ([redacted])
- Muis, wild type coronavirussen
  - Balb/c – vrouw ([redacted])
  - Tg – geen specificatie ([redacted])
- Muis, aangepaste coronavirussen
  - Balb/c – vrouw ([redacted])
- Konijn – vrouw ([redacted])
- Fret, man/vrouw – ([redacted])
- Kat, vrouw – ([redacted])

De keuze van het geslacht zal meegenomen in de aanvraag van de verschillende dierproeven die uitgevoerd zullen worden binnen dit project en deze keuze zal ook voorgelegd en beoordeeld worden door de IvD. Hierin zullen de onderstaande overwegingen meegenomen worden, niet gerangschikt op basis van prioriteit in de overweging:

- Beschikbaarheid van de dieren (van een bepaald geslacht);
- Eerder uitgevoerde experimenten (al dan niet uitgevoerd door de aanvrager of gecommuniceerd door de opdrachtgever aan de aanvrager) waarmee vergeleken dient te worden;
- Bepaalde keuze van geslacht vanuit wetenschappelijk of regelgevend oogpunt.

Bij het aanvragen van de verschillende dierproeven zal toezicht gehouden worden (door middel van toetsing van werkprotocollen inclusief de rechtvaardiging voor het geslacht bij IvD) over het gelijkwaardig gebruik van de verschillende geslachten tussen de dierproeven.

Los van bovenstaande argumenten willen wij nog toevoegen dat voor experimenten waarbij ook inperking een belangrijke factor is (BSL klasse II of III), er een logistiek probleem is in het uitvoeren van dierproeven met beide geslachten. Zoals in de bijlage benoemd zullen de experimenten onder zeer gecontroleerde omstandigheden uitgevoerd worden, waarbij bij experimenten met coronavirussen altijd gebruik gemaakt wordt voor de hoogst mogelijke inschaling BSL III (en dus isolator huisvesting) in verband met potentiële aerosol transmissie tussen groepen maar ook van dieren naar onderzoekers/biotechnici. Per isolator kan maar één sexe worden gehuisvest.

Geschatte aantallen, totaal per diersoort, zie de tabel in 2A voor de onderliggende berekening:

Muis (wildtype): [redacted]

Muis (transgeen): [redacted]

Fret: [redacted]

Kat: [redacted]

Hamster: [redacted]

Konijn: [redacted]

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

Nee

Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

**Vervanging:** Het bepalen van de werkzaamheid van coronavirus-specifieke antivirale interventiestrategieën kan enkel plaatsvinden in intacte dieren met een functionerend afweersysteem. De virologische en (histo)pathologische parameters die hiervoor van belang zijn kunnen niet in proefdiervrije alternatieven gegenereerd worden.

**Vermindering:** Het ingeschatte aantal dieren is gekozen aan de hand van op virologische studies beschreven statistische analyses van werkzaamheidsstudies, waarin een groepsgrootte van █ adequaat wordt geacht om 1 log<sub>10</sub> verschillen in virale load significant te kunnen bepalen (█). Indien uit studies uit te voeren in het huidige project blijkt dat, bv. door beperkte spreiding in de uitkomsten, met minder dieren evengoed robuuste resultaten te behalen zijn zal dit voortschrijdende inzicht gebruikt worden voor het opstellen van werkprotocollen waarin deze vermindering concreet gemaakt wordt. Tevens zijn in Modules 4 en 5, die gebruikt worden om de toedieningsschema's van de antivirale preparaten op te zetten, go/no-go momenten ingebouwd die gebruikt worden om te bepalen of de uit te testen preparaat/preklinisch model combinatie geschikt is om werkzaamheidsstudies uit te voeren.

**Verfijning:** De gekozen modellen zijn de enige tot dusver beschikbare modellen voor de beschreven coronavirusinfecties. Bij de keuze van het te gebruiken model voor een specifieke studie zal een nauwkeurige afweging gemaakt worden op basis van het te testen preparaat en de bijbehorende achtergrondinformatie, het beoogde virale agens (SARS-, MERS- of een nog onbekend coronavirus: X-CoV) en de gewenste uitleesparameters. Deze overwegingen zullen overlegt worden aan de IvD bij het indienen van de werkprotocollen voor uitvoering van de studies in het kader van dit project.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Toedienings- en afnameprocedures zullen waar nodig onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie plaatsvinden. De dieren worden dagelijks verzorgd en geobserveerd om de gezondheidsstatus bij te houden en hun welzijn te garanderen. Er zijn humane eindpunten gedefinieerd om onnodig ernstig ongerief te voorkomen (zie J.).

Nadelige milieueffecten worden tot een minimum beperkt doordat gewerkt wordt onder DM-III omstandigheden in faciliteiten waarvoor destructie- en afvoerprocedures voor afval vastgelegd zijn.

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.v.t.

### **Huisvesting en verzorging**

#### **F. Huisvesting en verzorging**

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

Nee

Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

#### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

### **Ongeriefinschatting/humane eindpunten**

#### **H. Pijn en pijnbestrijding**

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Toedienings-, infectie- en afnameprocedures zullen indien nodig onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie plaatsvinden.

#### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Afhankelijk van de virulentie van de gebruikte virusstam en de proefdiersoort kan er in meer dan wel mindere mate sprake zijn van klinische symptomen als gevolg van de coronavirusinfectie. De klinische symptomen die voor de preklinische modellen die in dit projectvoorstel gebruikte worden zijn met name respiratoir van aard: deze kenmerken zich door een verhoogde ademhalingsfrequentie tot moeizaam ademen waarbij de flanken zichtbaar overdreven ingetrokken worden, de dieren gestrekt gaan liggen (teneinde de luchtwegen zoveel mogelijk toegankelijk te houden) en lethargisch zijn en/of een stukkende ademhaling (dyspneu). Zie ook humane eindpunten bij sectie J.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak is de coronavirusinfectie.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

Tweemaal daags observatie van de dieren vanaf infectie. De observatiefrequentie zal verhoogd worden indien nodig, mochten observaties daartoe aanleiding geven. Er zijn humane eindpunten gedefinieerd, zie J.

#### **J. Humane eindpunten**

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Infecties met coronavirussen kunnen, afhankelijk van het model, leiden tot een ziektebeeld dat gekenmerkt wordt door respiratoire problemen, dyspneu (zie voor omschrijving hiervan de humane eindpunten hieronder), afwezigheid van eetlust, lethargie en gewichtsverlies. Na infectie zullen de dieren uitvoerig gevolgd worden voor het detecteren van deze verschijnselen.

De dieren worden geëuthanaseerd als zich één of enkele van de volgende omstandigheden zich voor doen:

1. Het dier eet of drinkt niet meer
2. Afname lichaamsgewicht (de dieren worden na infectie dagelijks gewogen):
  - a. > 15% in 2 dagen
  - b. > 20% t.o.v. aanvangsgewicht
3. Er kan sprake zijn van matig-ernstige ademhalingsproblemen als gevolg van de coronavirusinfectie: deze kenmerken zich door een verhoogde ademhalingsfrequentie (matig ongerief, geen humaan eindpunt) tot moeizaam ademen waarbij de flanken zichtbaar overdreven ingetrokken worden, de dieren gestrekt gaan liggen (teneinde de luchtwegen zoveel mogelijk toegankelijk te houden) en lethargisch zijn (deze combinatie wordt ingeschaald als ernstig ongerief) of een stokkende ademhaling (dyspneu) (beide zijn humane eindpunten).

De beschreven HEP's zijn algemeen van toepassing op infecties met virussen die impact hebben op het respiratoire systeem van de verschillende diermodellen, zoals voor de bekende SARS/MERS modellen. De aanname dat deze HEP's ook op infecties met nieuwe coronavirusvarianten in deze modellen van toepassing zijn is dan ook reëel. Er is uitgebreide ervaring bij het personeel van de aanvrager in studies met respiratoire infecties en de toepassing van de bijbehorende HEP's waardoor toepassing ervan bij nieuwe virusvarianten nauwgezet plaats zal kunnen vinden.

De virusreplikatiekinetiek in de beschreven modellen verloopt doorgaans binnen een periode van 7 dagen, zowel voor asymptomatische modellen als voor modellen waarbij klinische verschijnselen optreden: voor SARS infecties bij fretten en in ACE2 muizen zijn 2 – 5 dagen na infectie HEP te verwachten in de controle/onbehandelde groepen.

Humane eindpunten die zich sporadisch kunnen voordoen in dierstudies in het algemeen zijn:

4. Het dier vertoont onbehandelbare wonden door bv. vechten of op andere wijze opgelopen.
5. Het dier vertoont een matig-ernstig afwijkend gedrags- en voortbewegingspatroon.

De dieren worden na de infectie tweemaal daags bekeken voor klinische symptomen. De observatiefrequentie zal verhoogd worden indien nodig, mochten observaties daartoe aanleiding geven. Hierop zal bij ieder individueel experiment toegezien worden – het verloop van (pilot) dose finding en time-course studies in eerdere studies (uitgevoerd in dit project of beschikbaar uit andere bronnen) zal veel gerichte data/informatie opleveren om de observatiefrequentie indien nodig te kunnen specificeren voor de studies in deze module.

Er zijn voornamelijk geen andere symptomen te verwachten.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

Gepubliceerde coronavirusinfecties in katten, hamsters en konijnen verlopen zonder klinische verschijnselen. In fretten is bij SARS-CoV infecties in 50% van de dieren lethargie gerapporteerd (██████████). In jonge inteeltmuizen verloopt de SARS-CoV infectie eveneens asymptomatisch. In oude (12 mnd) Balb/c muizen zijn klinische verschijnselen als opstaande haren, gewichtsverlies (< 10%) en lichte dehydratie gerapporteerd (██████████). In huDPP4 knock-in muizen die voor MERS-CoV infecties gebruikt worden verloopt de infectie zonder manifestatie van klinische verschijnselen (██████████). Samenvattend lijkt de kans op het bereiken van de humane eindpunten in deze modellen zeer klein (<5%). In ACE2 transgene muizen geïnfecteerd met SARS-CoV zijn klinische verschijnselen als >20% gewichtsverlies en mortaliteit gerapporteerd (██████████). In dit model is de inschatting dat in de werkzaamheidsstudies dan ook waarschijnlijk ~50% een humaan eindpunt zal bereiken. In het geval dat er studies uitgevoerd worden met aan de muis geadapteerde virusstammen afkomstig uit Module 2 is het gezien eerdere publicaties van soortgelijke experimenten aannemelijk dat afhankelijk van de dosering >20% gewichtsverlies binnen 3-5 dagen kan optreden. Ook in dit model is de inschatting dat waarschijnlijk ~50% een humaan eindpunt bereiken.



Voor studies van nog onbekende coronavirussen (bv. isolaten van een toekomstige uitbraak) is een inschatting op voorhand niet te maken. De informatie hiervoor zal verkregen worden in studies uitgevoerd in Modules 1 t/m 3 en bij indienen van de werkprotocollen zal deze informatie met de IvD gedeeld worden. De ervaring van de aanvrager met respiratoire infecties in de modeldieren en de heldere humane eindpunten dragen bij aan een minimalisatie van het op te treden ongerief.

De kans op het optreden van de algemene humane eindpunten (4 en 5) wordt zeer klein geacht,  $\leq 1\%$ .

#### **K. Classificatie van ongerief**

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Coronavirusinfecties in katten, hamsters en konijnen en in enkele Balb/c muizenmodellen verlopen zonder klinische verschijnselen. Het maximale cumulatieve ongerief in deze modellen dan ook ingeschaald als licht tot matig, afhankelijk van het toedienings- en afnameschema.

De beschreven HEP's voor modellen met klinische verschijnselen verminderen het optreden van ernstig ongerief, maar 100% garantie op het voorkomen ervan is niet af te geven. Kortdurend ernstig ongerief in modellen met klinische symptomen (fretten, ACE2 Tg muizen, Balb/c muizen in enkele modellen) is dan ook niet uit te sluiten maar dit zal tot een minimum beperkt worden door verhoogde observatiefrequentie wanneer dit noodzakelijk wordt geacht. Voor deze modellen kan voor een deel van de dieren (zie ook J) het maximale cumulatieve ongerief dan ook als ernstig worden ingeschaald. De beschreven HEP's zijn van toepassing op infecties met virussen die impact hebben op het respiratoire systeem van de verschillende diermodellen, zoals voor de bekende SARS/MERS modellen, maar ook voor bv. infectiemodellen voor hoogpathogene influenzavirussen. Met al deze modellen heeft de aanvrager veel ervaring, waardoor nauwkeurige ongeriefinschatting en bepaling van het bereiken van HEPs in de experimenten gewaarborgd is.

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

Nee

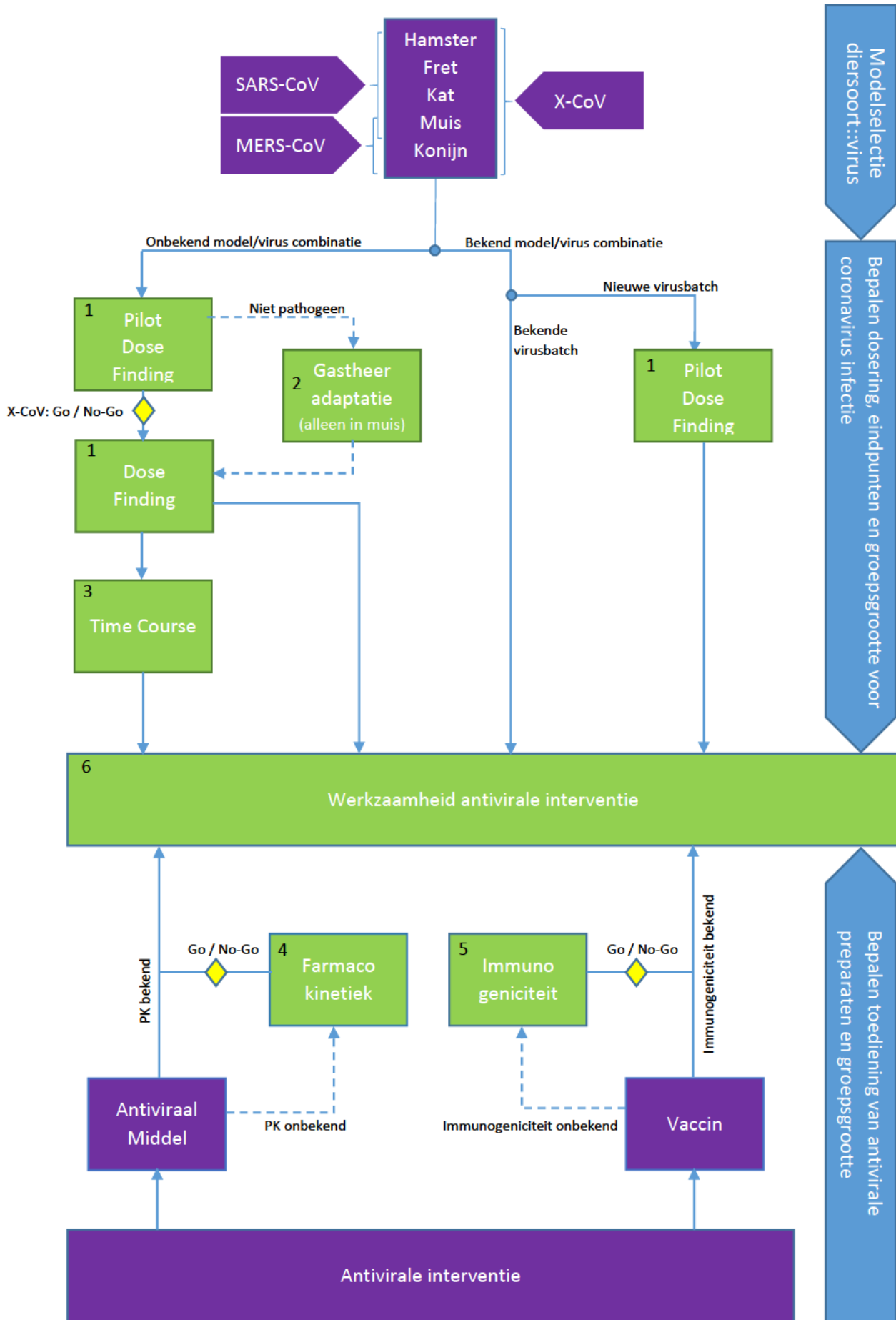
Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

De dieren kunnen na een infectie met coronavirussen (BSL-3) niet voor andere doeleinden gebruikt worden: SARS- en MERS-CoV zijn beide geclassificeerd als BSL-3, voor nieuw geïsoleerde virusstammen in uitbraaksituaties is de verwachting dat ook deze als zodanig geclassificeerd zullen worden. Daarnaast zal de virale load en (histo)pathologische afwijkingen in longmateriaal en ander respiratoire weefsels bepaald worden.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

██████████  
Nistelrooise Baan 3

5347 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD905002015283

**Bijlagen**

2

Datum 15 februari 2016

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ██████████,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 februari 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002015283. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

#### Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 90500  
Naam instelling of organisatie: BioXpert B.V.  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 54838134  
Straat en huisnummer: Nistelrooise Baan 3  
Postcode en plaats: 5347 RE SCHAIJK  
IBAN: NL72RABO0183605888  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: BioXpert B.V.

#### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 15 maart 2016  
Geplande einddatum: 14 maart 2021  
Titel project: Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen  
Titel niet-technische samenvatting: Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen  
Naam DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]


**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1870,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

**Ondertekening**

Naam:   
Functie: Vergunninghouder  
Plaats: Schaijk  
Datum: 10 februari 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3

5347 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD905002015283

**Bijlagen**

2

Datum 15 februari 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 15 februari 2016

Vervaldatum: 16 maart 2016

Factuurnummer: 16700283

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015283	€

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS0569996317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** maandag 15 februari 2016 14:39  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD905002015283  
**Bijlagen:** AVD905002015283\_Dierproef\_Module\_6\_EFF\_10Feb2016.docx; AVD905002015283\_Dierproef\_Module\_2\_GA\_10Feb2016.docx; AVD905002015283\_projectvoorstel\_10Feb2016.docx; AVD905002015283\_Dierproef\_Module\_3\_TC\_10Feb2016.docx; AVD905002015283\_aanvraag\_projectvergunning\_10Feb2016.docx; AVD905002015283\_Dierproef\_Module\_5\_IMM\_10Feb2016.docx; AVD905002015283\_Dierproef\_Module\_4\_PK\_10Feb2016.docx; AVD905002015283\_NTS\_10Feb2016.docx; AVD905002015283\_Dierproef\_Module\_1\_DF\_10Feb2016.docx

Geachte leden van [REDACTED]

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen" en aanvraagnummer: AVD905002015283.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van de beveiligde verbinding.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 15-02-2016, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager kan de termijn worden opgeschort. U dient de CCD zo spoedig mogelijk op de hoogte te stellen van deze opschorting. Zodra de opschortende termijn is beëindigd, stelt u de CCD hiervan onverwijld op de hoogte. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt.

Met vriendelijke groeten,

CCD

# Format DEC-advies

---

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

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD905002015283
2. Titel van het project: Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen.
3. Titel van de NTS: Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: [REDACTED]
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 17-11- 2015
  - aanvraag compleet: 17-11-2015
  - in vergadering besproken: 02-12-2015 en 13-01-2016  
anderszins behandeld  
termijnonderbreking(en) van / tot  
besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met  
maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 06-01-2016 en 04-02-2016
  - advies aan CCD: 08-02-2016
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 06-12-2015 en 19-01-2016
  - Strekking van de vragen:  
De correspondentie d.d. 06-12-2015 had betrekking op:
    - o De beschrijving en onderbouwing van de strategie voor de keuze van een bepaald diermodel in het geval van (varianten op) reeds bekende coronavirussen (SARS, MERS), alsmede voor het ontwikkelen van

diermodellen in het geval van een nieuw coronavirus. Verheldering van de bijgevoegde flowchart.

- Toelichting in hoeverre gewaarborgd kan worden dat gekozen wordt voor het diermodel met het minste ongerief.
- Criteria waaraan een coronavirus moet voldoen om een bepaald traject/model te kiezen.
- Toelichting of er één of meerdere diermodellen worden gebruikt voor het testen van één preparaat. Nadere onderbouwing in geval er voor het testen van één preparaat meerdere diermodellen worden gebruikt.
- Onderbouwing van de aantallen groepen, aantallen dieren en aantallen experimenten.
- Beschrijving van dose-finding studies in niet-symptomatische modellen en de daarbij te hanteren criteria voor het bepalen van de virusload.
- Toelichting en onderbouwing van de keuze voor gastheer-adaptatie van het virus bij muizen. Toelichting van de te volgen strategie als het niet mogelijk blijkt het virus aan de muis te adapteren. Beschrijving van de experimentele procedures bij gastheer-adaptatie.
- Vermelding van en toelichting op het geslacht en de gekozen levensstadia van de te gebruiken dieren.
- Beschrijving van het verwachte tijdstip van het optreden van klinische verschijnselen. Afstemmen van de observatiefrequentie op de te verwachten klinische verschijnselen en het verloop daarvan.
- Differentiëren van de inschatting van het ongerief naar ongeriefsklasse en naar diersoort; vermelding van het geschatte percentage van de dieren waarop een bepaalde ongeriefsklasse van toepassing is.
- Beschrijving van en toepassing van de humane eindpunten, telkens toegespitst op het desbetreffende type dierproef en in het bijzonder in het geval van een nieuw coronavirus.
- Redactionele aspecten: Nader verduidelijken dan wel toespitsen van diverse tekstpassages en een logische en consequente opname van tekstpassages bij de desbetreffende (sub)hoofdstukken in elk formulier. Gebruik van vaktaal en moeilijk taalgebruik in de NTS.

- De correspondentie d.d. 19-01-2016 had betrekking op:

- Helderder beschrijving van criteria die worden gehanteerd bij de keuze van het diermodel en een toelichting in hoeverre de mate van de verwachte welzijnsaantasting hierbij een rol speelt.
  - Toevoegen van de ontbrekende flowchart.
  - Helderder beschrijving en onderbouwing voor de keuze van het geslacht en van de leeftijd van de dieren.
  - Redactionele aspecten: Nader verduidelijken dan wel toespitsen van diverse tekstpassages, duidelijk gebruik van bepaalde termen (vaktaal). Aandacht voor correcte beschrijving van de verwachte welzijnsaantasting per diersoort en consequent doorvoeren daarvan in alle formulieren.
- Datum antwoord: 06-01-2016 en 04-02-2016
  - Strekking van het de antwoorden: De vragen en opmerkingen van de DEC zijn naar tevredenheid beantwoord; aanvraag na bijstelling volledig en duidelijk.
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t., de DEC beschikt zelf over de relevante expertise.

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project of de aanvrager.

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

1. Het project is:
  - X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling.

In de afgelopen 15 jaar zijn er uitbraken geweest van nieuwe zgn. SARS en

MERS coronavirussen, met hoge sterftepercentages als gevolg. Van de geïnfecteerde mensen overleed 10% tot 40%. Naast grote gevolgen voor de gezondheid van de geïnfecteerde mensen, hadden deze uitbraken een enorme impact op de economie, met name in de Aziatische landen.

Deze coronavirussen werden vanuit dieren overgedragen op mensen, waarna overdracht van mens-op-mens de uitbraak verergerde. Door toepassing van breedspectrum antibiotica en een strikt klinisch management is men er in geslaagd de SARS-uitbraak onder controle te krijgen. In het geval van de MERS-epidemie is dit echter nog steeds niet het geval. Op dit moment zijn er nog geen specifieke antivirale interventiemiddelen tegen SARS of MERS geregistreerd voor gebruik. Er is derhalve grote behoefte aan vaccins en antilichaampreparaten of antivirale middelen die, al dan niet gecombineerd, voor preventie en behandeling kunnen worden ingezet.

Wereldwijd vinden surveillances plaats om zo spoedig mogelijk nieuwe virusuitbraken te kunnen detecteren. Enerzijds betekent dit het karakteriseren van virussen bij dieren die mogelijk kunnen overspringen naar de mens en anderzijds het karakteriseren van nieuwe virussen bij de mens en het ontwikkelen van interventiestrategieën. In de context van deze initiatieven wordt tevens getracht vergelijkbare coronavirusuitbraken in een vroeg stadium te detecteren, zodat ontwikkeling van bestrijdingsmethoden zo snel mogelijk kan worden opgestart. In dit verband is het wenselijk om snel een diermodel te kunnen selecteren dat ingezet kan worden om de ontwikkeling van antivirale interventiestrategieën te ondersteunen.

Voor de ontwikkeling van middelen en methoden om coronavirusinfecties te bestrijden dienen deze middelen eerst te worden getest in diermodellen voordat deze in de mens kunnen worden toegepast. Dit is een essentiële schakel in het ontwikkelingstraject van een in de mens toepasbaar medicijn. De aanvrager biedt als zgn. CRO aan derden verschillende preklinische modellen aan om deze antivirale preparaten uit te testen.

Dit project heeft tot doel om de werkzaamheid van antivirale interventiestrategieën (antivirale middelen, vaccins) tegen huidige en mogelijk nieuwe coronavirusinfecties te bepalen in beschikbare diermodellen. De uit dit project verkregen resultaten dragen bij aan de ontwikkeling en registratie van antivirale interventiestrategieën, die kunnen worden ingezet tegen actuele en toekomstige uitbraken van coronavirussen.

- De commissie schat het belang van het project in als een substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De instelling heeft een uitgebreide ervaring met het uitvoeren van dit soort testen (in opdracht van derden) en beschikt over gespecialiseerde kennis m.b.t. de gebruikte diermodellen en met de respiratoire infecties die in deze diermodellen kunnen optreden.
  5. Er is in wettelijk opzicht geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuzes met betrekking tot deze zaken zijn voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Voor onderzoek aan (antivirale interventiestrategieën tegen) SARS en MERS coronavirus is een aantal diermodellen beschikbaar. Voor SARS betreft dit (transgene) muis, hamster, fret en kat en voor MERS betreft dit konijn en muis. Afhankelijk van de vooraf beschikbare informatie over het specifieke coronavirus en de uit te testen antivirale interventiestrategieën zal per geval (gebaseerd op een 'informed decision') een keuze voor het te gebruiken diermodel worden gemaakt. Omdat het niet mogelijk is nieuwe uitbraken te voorspellen zijn de in dit projectvoorstel beschreven dierproeven mede gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet, vergelijkbaar met de SARS uitbraak in 2003 en de MERS uitbraak in 2012. Dit kan dan gaan om nieuwe varianten van MERS en SARS, maar ook om een nieuwe coronavirusvariant. Verwacht wordt dat de op MERS gerichte diermodellen (muis en konijn) in dit project het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn.
  6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Fretten en muizen kunnen door de infectie met bekende coronavirussen ademhalingsproblemen krijgen. In de overige diersoorten verloopt de infectie met bekende coronavirussen asymptomatisch. De dieren kunnen ongerief ondervinden als gevolg van de toedienings- en afnameprocedures. De meest ingrijpende handelingen zullen uitgevoerd worden onder verdoving. De klinische symptomen en het daaraan verbonden ongerief in het geval van een infectie met een nieuwe coronavirus is op voorhand nog niet precies in te schatten. Dieren die het humane eindpunt

bereiken worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd.

De cumulatieve aantasting van het welzijn voor de verschillende diermodellen wordt als volgt ingeschat: voor 75% van de muizen als licht, 15% matig en 10% maximaal ernstig; voor 70% van de fretten als licht, 15% matig en 15% ernstig; voor 85% van de katten als licht en 15% matig; voor 85% van de hamsters als licht en 15% matig; voor 80% van de konijnen als licht en 20% matig. Kortdurend ernstig ongerief is niet geheel uit te sluiten in modellen met klinische symptomen, maar zal tot een minimum beperkt worden door een verhoogde observatiefrequentie wanneer dit noodzakelijk wordt geacht.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De te testen stoffen zijn eerst in laboratoriumproeven zonder gebruik van proefdieren op werkzaamheid getest, voordat ze in een relevant diermodel worden getest. De effectiviteit van de te testen middelen kan alleen worden getest in het intacte dier met een functionerend immuunsysteem.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager voert de studies als zgn. CRO uit voor derden. Aangezien het niet mogelijk is om uitbraken te voorspellen zijn de aantallen dieren mede gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet, vergelijkbaar met de uitbraak voor SARS in 2003 en MERS in 2012.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

## **D. Ethische afweging**

Op basis van de overwegingen onder bovenstaand punt C (1 t/m 9) komt de commissie tot de volgende ethische afweging.

Uitbraken van de zgn. SARS en MERS coronavirussen betekenen door de ernstige ziekteverschijnselen en de hoge mortaliteit een serieuze bedreiging voor de

volksgezondheid en leveren bovendien aanzienlijke economische schade op, tot nu toe met name in de Aziatische landen. Op dit moment is de SARS-uitbraak onder controle, maar voor de MERS-epidemie is dit nog niet het geval. Bovendien is het reëel te verwachten dat zich binnen de komende 5 jaar een nieuwe uitbraak zal voordoen van een variant van het SARS of MERS virus dan wel van een nieuw coronavirus. Op dit moment zijn er nog geen specifieke antivirale interventiemiddelen tegen SARS of MERS geregistreerd voor gebruik. Er is derhalve grote behoefte aan vaccins en antilichaampreparaten of antivirale middelen die, al dan niet gecombineerd, voor preventie en behandeling kunnen worden ingezet. Wereldwijd wordt er naar gestreefd toekomstige vergelijkbare coronavirusuitbraken in een vroeg stadium te detecteren zodat de ontwikkeling van bestrijdingsmethoden zo snel mogelijk kan worden opgestart. Het is in dat kader van belang om snel over een diermodel te kunnen beschikken dat ingezet kan worden om de ontwikkeling van antivirale interventiestrategieën te ondersteunen.

De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. Naar het oordeel van de DEC dient dit project een substantieel belang.

Tegenover dit belang staat het feit dat alle dieren in de experimenten een zekere mate van welzijnsaantasting zullen ondervinden. De mate hiervan is afhankelijk van het te kiezen diermodel en het desbetreffende coronavirus. Voor het merendeel van de dieren is een geringe aantasting van het welzijn te verwachten, en in mindere mate is er sprake van een matige dan wel ernstige aantasting van het welzijn.

De commissie is ervan overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling is gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is naar het oordeel van de commissie onvermijdelijk, wil men de doelstellingen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste substantiële belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.



## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3  
5374 RE SCHAIJK

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD905002015283

**Uw referentie**

Datum **22 MAART 2016**  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte [REDACTED],

Op 15 februari 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen" met aanvraagnummer AVD905002015283. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 21 maart 2016 tot en met 14 maart 2021. De startdatum wijkt af van wat u heeft aangevraagd, omdat de door u aangevraagde datum in het verleden ligt. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Beoordeling achteraf**

Na afloop van het project zal er een beoordeling achteraf plaatsvinden in verband met de ongerief classificatie Ernstig, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

**Procedure**

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie [REDACTED]. Dit advies is opgesteld op 8 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Aanvullend stelt de CCD twee algemene voorwaarden aan meerjarige projecten. Dit om te voldoen aan wat voortkomt uit artikel 10a van de wet. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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


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

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

### **Meer informatie**

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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

### **Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: BioXpert bv  
Adres: Nistelrooise Baan 3  
Postcode en woonplaats: 5374 RE SCHAIJK  
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 21 maart 2016 tot en met 14 maart 2021, voor het project "Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen" met aanvraagnummer AVD905002015283, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED].  
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Voorzitter IvD verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 februari 2016;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 15 februari 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 15 februari 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 8 februari 2016, ontvangen op 21 februari 2016.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
bijlage 3.4.4.1: Module 1: Dose finding coronavirusinfecties	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	[REDACTED]	Licht
bijlage 3.4.4.1: Module 1: Dose finding coronavirusinfecties	Fretten ( <i>Mustela putorius furo</i> )	[REDACTED]	Ernstig
bijlage 3.4.4.1: Module 1: Dose finding coronavirusinfecties	Katten ( <i>Felis catus</i> )	[REDACTED]	Licht
bijlage 3.4.4.1: Module 1: Dose finding coronavirusinfecties	Hamster	[REDACTED]	Licht
bijlage 3.4.4.1: Module 1: Dose finding coronavirusinfecties	Konijnen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	[REDACTED]	Licht
bijlage 3.4.4.2: Module 2: Gastheeradaptatie coronavirussen	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	[REDACTED]	Ernstig
bijlage 3.4.4.3: Module 3: Time-course coronavirusinfecties	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	[REDACTED]	Ernstig
bijlage 3.4.4.3: Module 3: Time-course coronavirusinfecties	Fretten ( <i>Mustela putorius furo</i> )	[REDACTED]	Ernstig
bijlage 3.4.4.3: Module 3: Time-course coronavirusinfecties	Katten ( <i>Felis catus</i> )	[REDACTED]	Licht
bijlage 3.4.4.3: Module 3: Time-course coronavirusinfecties	Konijnen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	[REDACTED]	Licht
bijlage 3.4.4.3: Module 3: Time-course coronavirusinfecties	Hamster	[REDACTED]	Licht

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
bijlage 3.4.4.4: Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen	Muizen (Mus musculus)	█	Matig
bijlage 3.4.4.4: Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen	Fretten (Mustela putorius furo)	█	Matig
bijlage 3.4.4.4: Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen	Katten (Felis catus)	█	Matig
bijlage 3.4.4.4: Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen	Konijnen (Oryctolagus cuniculus)	█	Matig
bijlage 3.4.4.4: Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen	Hamster	█	Matig
bijlage 3.4.4.5 Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten	Muizen (Mus musculus)	█	Matig
bijlage 3.4.4.5 Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten	Fretten (Mustela putorius furo)	█	Matig
bijlage 3.4.4.5 Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten	Hamster	█	Matig
bijlage 3.4.4.5 Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten	Katten (Felis catus)	█	Matig
bijlage 3.4.4.5 Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten	Konijnen (Oryctolagus cuniculus)	█	Matig
bijlage 3.4.4.6 Module 6: Werkzaamheid antivirale interventiestrategieën	Muizen (Mus musculus)	█	Ernstig

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd in verband met de ongeriefclassificatie Ernstig. Deze beoordeling dient uiterlijk maart 2022 bij de CCD te worden ingediend.

#### Voorwaarden

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

- De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go beslissingen worden genomen met instemming van de IvD.

- In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdooving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdooving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **Einde van een dierproef**

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

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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

#### **Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Er zal beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van de dierproeven conform de vergunning waren.

Inventaris Wob-verzoek W17-05									
nr.	document NTS 2016320	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	NTS initieel				x	x			
3	NTS aangepast				x	x			
4	NTS definitief	x							
5	Projectvoorstel				x	x		x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x		x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x		x	
8	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x	x		x	
9	Bijlage beschrijving dierproeven 1 aangepast				x	x		x	
10	Bijlage beschrijving dierproeven 3 aangepast				x	x		x	
11	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
12	Verzoek om aanvullende informatie				x	x	x	x	
13	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x	x	x	x	
14	DEC advies				x		x	x	
15	Advies CCD aan bestuur		x						x
16	Beschikking				x	x	x	x	





1 1 MRT 2016

# Centrale Commissie Dierproeven

1.

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

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

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

*320  
 AUD 90500 2015412*

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

Naam instelling of organisatie	BioXpert B.V.
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
KvK-nummer	54838134

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

Straat en huisnummer	Nistelrooise Baan	3
Postbus		
Postcode en plaats	5374RE	Schaijk
IBAN	NL72RABO0183605888	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

Tenaamstelling van het rekeningnummer	BioXpert BV	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[REDACTED]	
Afdeling	Viroclinics Biosciences B.V.	
Telefoonnummer	[REDACTED]	
E-mailadres	[REDACTED]	

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

(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Functie	[REDACTED]	
Afdeling	Viroclinics Biosciences B.V.	
Telefoonnummer	[REDACTED]	
E-mailadres	[REDACTED]	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |              |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 3 - 2016 |
| Einddatum  | 1 - 3 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Procedure training and analysis of neurovirulence of secreted polio viruses in OPV recipients
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Procedure training en analyse van neurovirulentie van uitgescheiden poliovirussen in OPV gevaccineerde vrijwilligers
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |              |
|-------------|--------------|
| Naam DEC    | WIL Research |
| Postadres   | [REDACTED]   |
| E-mailadres | [REDACTED]   |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging
- 

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[REDACTED]
Functie	Vergunninghouder
Plaats	Schaijk
Datum	18 2 - 2016
Handtekening	[REDACTED]

11 MRT 2016



**BioXpert B.V.**

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

info@bioxpert.nl  
www.bioxpert.nl

Aan: Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Datum: 10 maart 2016

Betref: Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD905002016412 en AVD905002015320

Geachte heer / mevrouw,

Bijgaand namens [REDACTED] de getekende aanvraag Projectvergunning Dierproeven AVD905002016412 met als titel: *Uittesten van levend verzwakte influenza vaccins in muizen en fretten.*

Tevens Projectvergunning Dierproeven AVD905002015320 met als titel: *Procedure training and analysis of neurovirulence of secreted polio viruses in OPV recipients.*

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

### 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Procedure training en analyse van neurovirulentie van poliovaccin batches en van uitgescheiden poliovirussen in OPV gevaccineerde vrijwilligers
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Polio, vaccin, neurovirulentie, veiligheid

### 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.  <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input checked="" type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven	

### 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Infecties met het poliovirus kunnen leiden tot permanente verlamming en andere blijvende gevolgen hebben voor mensen die ermee geïnfecteerd raken. Vanaf 1988 is er een wereldwijd initiatief opgestart die erop is gericht om infecties met het poliovirus uit te roeien. Hiertoe zijn op grote schaal veel vaccinatieprogramma's uitgevoerd die tot een flinke afname van het aantal gevallen heeft geleid. Uitroeien tot 0%, het laatste stapje, is het moeilijkst. Hiertoe is het noodzakelijk dat naast de beschikbare vaccins nieuwe vaccins ingezet worden. Poliovaccins moeten uitgebreid getest worden op hun veiligheid teneinde het optreden van verlamming door vaccinatie tot een minimum te beperken. Hiervoor zijn testen ontwikkeld die uitgevoerd worden in muizen. Voor toelating van nieuwe medicijnen (incl. vaccins) tot de Europese markt dienen deze een regulatorisch pad te volgen teneinde geregistreerd te kunnen worden voor humaan gebruik. Voor Europa is het de EMA (European Medicines Agency) die als wettelijke autoriteit toe ziet
---	---

op deze procedure. Onderdeel van een registratieprocedure zijn klinische trials waarin veiligheid en werkzaamheid van de medicijnen in ontwikkeling wordt vastgesteld. De opzet van deze klinische trials is gebonden aan (volg link) [Directive 2001/20/EC](#).

De doelstelling van het project is tweeledig:

1. Primair is het bepalen van de mate van neurovirulentie van poliovaccins en van poliovirussen die uitgescheiden worden door vrijwilligers die gevaccineerd zijn met (nieuw) poliovaccin.
2. Secundair is de vereiste training van technisch personeel op de toedieningsmethode in muizen en de klinische score van de muizen volgens WHO instructies welke nodig is voor het uitvoeren van de primaire doelstelling

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Getraind personeel wordt ingezet om de gewenste veiligheid van vaccins te kunnen bepalen. De test wordt gebruikt om een (nieuw) vaccin tegen polio te testen op veiligheid opdat deze kan worden ingezet voor het uitvoeren van het programma dat erop is gericht om infecties met poliovirus uit te roeien.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Laboratorium muizen. ICR stam (geschat aantal: █████) en █████ stam (geschat aantal: █████).

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Er is een kleine kans op overlijden als gevolg van de toedieningsmethode. De kans hierop wordt zo klein mogelijk gemaakt door de toepassing van uitgebreide trainingsprocedures die zijn opgesteld door de WHO. Proefdieren die worden behandeld met een positieve controle, neurovirulent poliovirus, zullen verlamingsverschijnselen ontwikkelen. Proefdieren die worden behandeld met (nieuw) poliovaccin *kunnen* verlamingsverschijnselen gaan ontwikkelen, maar hier is de kans aanzienlijk kleiner omdat vaak van eerdere vaccinbatches al is vast komen te staan dat het betreffende vaccin type niet neurovirulent is.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Matig

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden geëuthanaseerd tijdens (bij bereiken van gedefinieerde humane eindpunten) of direct na afloop van de proef.

## 4 Drie V's

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

Er zijn laboratoriumtesten beschikbaar die het mogelijk maken om zonder gebruik van proefdieren de veiligheid van poliovaccins te onderzoeken. Echter, deze methoden kunnen niet als alternatief worden gebruikt omdat ze onvoldoende gevoelig zijn. De in dit project beschreven testprocedure is de enige die door de WHO als veiligheidstest geaccepteerd wordt.

#### 4.2 **Vermindering**

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

Het aantal te gebruiken dieren per test wordt voorgeschreven door de standaardprocedure van de WHO. Deze is op basis van grondig onderzoek tot stand gekomen om met zo min mogelijk dieren een zo groot mogelijke zekerheid van de test te bewerkstelligen. Daarnaast is goede training zoals beschreven in het project noodzakelijk om het aantal benodigde dieren te minimaliseren.

#### 4.3 **Verfijning**

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

De muisoorten die gebruikt worden zijn als beste geselecteerd uit meerdere beschikbare transgene muisstammen en voorgeschreven door de WHO. De WHO heeft met deze muizensoort het model gestandaardiseerd en deze wereldwijd geldende standaardisatie met bijbehorende intensieve training gegeven door één specifiek instituut kan als belangrijke verfijning worden gezien.

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

Uitgebreide training leidt tot gekwalificeerd personeel en vermindering van de negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn. Met het trainingsprogramma wordt alleen aangevangen als vaststaat dat het daadwerkelijk testen van vaccinbatches en/of fecesmonsters binnen 6 maanden na afronden van de training kan beginnen. Handelingen vinden waar mogelijk dan wel wenselijk onder verdoving plaats.

De dieren worden dagelijks gecontroleerd op welzijn.

Er zijn humane eindpunten vastgesteld die gebruikt worden om de negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren te minimaliseren. Bij het bereiken van deze humane eindpunten zullen die dieren uit de proef genomen worden middels euthanasie.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Testen van veiligheid van poliovaccins en van uitgescheiden poliovirussen in gevaccineerde individuen in het muizenmodel
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Polio, vaccin, verlamming, veiligheid

## 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.  <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input checked="" type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

## 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Infecties met het poliovirus kunnen leiden tot permanente verlamming en andere blijvende gevolgen voor mensen die ermee geïnfecteerd raken. Vanaf 1988 is er een wereldwijd initiatief opgestart die erop is gericht om infecties met het poliovirus uit te roeien. Hiertoe zijn op grote schaal vaccinatieprogramma's uitgevoerd die tot een flinke afname van het aantal gevallen hebben geleid. Uitroeien tot 0%, het laatste stapje, is het moeilijkst. Hiertoe is het noodzakelijk dat naast de beschikbare vaccins nieuwe vaccins ingezet worden waaronder verbeterde varianten van levend verzwakte vaccins. Laatstgenoemde vaccins moeten uitgebreid getest worden op veiligheid om het optreden van verlamming door vaccinatie tot een minimum te beperken. Deze verlamming wordt veroorzaakt als gevolg van een infectie in de hersenen door het vaccin, dit noemen we neurovirulentie. Om dit uit te zoeken zijn testen ontwikkeld die uitgevoerd worden in muizen. Voor toelating van nieuwe medicijnen (incl. vaccins) tot de Europese markt dienen
---	--



deze geregistreerd te worden voor humaan gebruik. Voor Europa is het de EMA (European Medicines Agency) die als wettelijke autoriteit toe ziet op deze procedure. Onderdeel van een registratieprocedure zijn klinische studies waarin veiligheid en werkzaamheid van de medicijnen in ontwikkeling wordt vastgesteld. De opzet van deze klinische studies is gebonden aan de Europese richtlijn: (volg link) [Directive 2001/20/EC](#).

De doelstelling van het project is tweeledig:

1. Primaire doelstelling is het bepalen van de mate van neurovirulentie van poliovaccins en van poliovirussen die uitgescheiden worden door individuen die gevaccineerd zijn met (nieuw) poliovaccin.
2. Secundaire doelstelling is de vereiste training van technisch personeel op de toedieningsmethode in muizen en de klinische score van de muizen volgens instructies van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) welke nodig is voor het uitvoeren van de primaire doelstelling.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Getraind personeel wordt ingezet om de gewenste veiligheid van vaccins te kunnen bepalen. Deze vaccins kunnen vervolgens worden ingezet voor het uitvoeren van het programma dat erop is gericht om infecties met poliovirus uit te roeien.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Laboratorium muizen. ICR stam (geschat aantal: █████) en █████ stam (geschat aantal: █████).

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Er is een kleine kans op overlijden als gevolg van de toedieningsmethode. De kans hierop wordt zo klein mogelijk gemaakt door de toepassing van uitgebreide trainingsprocedures die zijn opgesteld door de WHO. Proefdieren die worden behandeld met een positieve controle, neurovirulent poliovirus, zullen verlamingsverschijnselen ontwikkelen. Proefdieren die worden behandeld met (nieuw) poliovaccin *kunnen* verlamingsverschijnselen gaan ontwikkelen, maar hier is de kans aanzienlijk kleiner omdat vaak van eerdere vaccinbatches al is vast komen te staan dat het betreffende vaccin type niet neurovirulent is.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Matig

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden geëuthanaseerd tijdens (bij bereiken van gedefinieerde humane eindpunten) of direct na afloop van de proef.

## 4 Drie V's

4.1 **Vervanging**  
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije

Er zijn laboratoriumtesten beschikbaar die het mogelijk maken om zonder gebruik van proefdieren de veiligheid van poliovaccins te onderzoeken. Echter, deze methoden kunnen niet als alternatief worden gebruikt omdat ze onvoldoende gevoelig zijn. De in dit project beschreven testprocedure is de enige die door de WHO als veiligheidstest geaccepteerd wordt.

alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

4.2 **Vermindering**

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

Het aantal te gebruiken dieren per test wordt voorgeschreven door de standaardprocedure van de WHO. Deze is op basis van grondig onderzoek tot stand gekomen om met zo min mogelijk dieren een zo groot mogelijke zekerheid van de test te bewerkstelligen. Daarnaast is goede training van biotechnisch personeel zoals beschreven in het project noodzakelijk om het aantal benodigde dieren voor de veiligheidstesten te minimaliseren.

4.3 **Verfijning**

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

De muissoorten die gebruikt worden zijn als beste geselecteerd uit meerdere beschikbare transgene muisstammen en voorgeschreven door de WHO. De WHO heeft met deze muizensoort het model gestandaardiseerd en deze wereldwijd geldende standaardisatie met bijbehorende intensieve training gegeven door één specifiek instituut kan als belangrijke verfijning worden gezien.

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

Uitgebreide training leidt tot gekwalificeerd personeel en vermindering van de negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn. Met het trainingsprogramma wordt alleen aangevangen als vaststaat dat het daadwerkelijk testen van vaccinbatches en/of patiënten materiaal binnen 6 maanden na afronden van de training kan beginnen. Handelingen vinden waar mogelijk dan wel wenselijk onder verdoving plaats.

De dieren worden dagelijks gecontroleerd op welzijn.

Door de WHO zijn humane eindpunten vastgesteld die gebruikt worden om de negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren te minimaliseren. Bij het bereiken van deze humane eindpunten zullen die dieren uit de proef genomen worden middels euthanasie.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Form Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

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

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

#### Introduction

Polioviruses can cause a subclinical or mild illness, aseptic meningitis, or paralytic poliomyelitis (spinal or bulbar paralysis) in humans. Recovery from poliovirus infection can be prolonged and incomplete, with

extremities remaining weak and prone to develop atrophy.

There are currently huge efforts by the World Health Organization (WHO) and partners to complete global polio eradication. Polioviruses (types 1, 2 and 3) could be the next eradicated human pathogens after Variola virus (causative agent of smallpox) which was declared eradicated by the WHO in 1980. The application of two types of poliovaccine, namely Inactivated Polio Vaccine (IPV) and Oral Polio Vaccine (OPV) has resulted in the significant decline in poliomyelitis cases caused by wild poliovirus in recent years. IPV is safe but a less effective than OPV. OPV, which is live-attenuated poliovirus, has the drawback that there are rare cases of poliomyelitis related to the use of classical live-attenuated OPV because during replication in the human gut after vaccination the vaccine virus could revert to the neurovirulent wild-type phenotype, Reverted OPV may cause disease and may even spread from-human-to-human. For instance, in 1999 Poliovirus type 2 could be declared eradicated because it was not detected in 2 consecutive years, but in 2009 it re-emerged causing outbreaks which appeared to involve reverted OPV2 vaccine virus.

Originally, both IPV and OPV were trivalent preparations, including the 3 types of poliovirus. Part of the eradication strategy is the switch from trivalent OPV to bivalent OPV (bOPV), since bOPV would be more efficacious. Future vaccinations will also include monovalent OPV when other serotypes will be eradicated. Also, because of the reversion to neurovirulent wild-type polio (VAPP; vaccine associated paralytic poliomyelitis), future strategies will include an OPV to IPV switch.

New generation OPVs, which are constructed to be more genetically stable than the classical OPVs formulations require assessment of safety in clinical trials\*. In order to minimize the risk of VAPP (vaccine associated paralytic poliomyelitis), part of the safety testing includes analysis of poliovirus present in stool samples of vaccine inoculated volunteers. Reversion of vaccine derived, replicating polioviruses to wild-type/neurovirulent strains needs to be carefully monitored in order to determine the safety profile of these vaccine formulations.

\*As a matter of course, the concerning OPV formulation will have been first tested directly in the WHO mouse NVT before it is used in the clinical trial

### **Safety testing of polio vaccines (main purpose of the present project proposal)**

Release of (monovalent, bivalent, trivalent) OPV batches requires testing for neurovirulence to ensure safety for human use, following WHO guidelines (WHO, 1990, WHO Technical Report Series No. 800). For this purpose, the monkey neurovirulence test (NVT) has been used for over 50 years (Contreras et al., 1988, J Biol Stand; Furesz & Contreras, 1993, Dev Biol Stand). Since the use of non-human primates has become increasingly difficult due to a multitude of reasons (ethical, economical, availability), the WHO initiated a project in the early 1990s to evaluate the suitability of poliovirus receptor (CD155) transgenic mice for OPV neurovirulence testing, resulting in a test procedure covering all poliovirus serotypes that is part of WHO recommendations for production and control of OPV (WHO, Expert Committee on Biological Standardization, 2012). The test is based on behavioural observations of groups of ████████ transgenic mice inoculated intraspinally with either a test vaccine or a standardized WHO reference material (Dragunsky, Bulletin of the WHO, 2003), the procedure of which is laid down in a Standard Operating Procedure (WHO SOP for neurovirulence testing of Oral Polio Vaccine using ████████ transgenic mice).

The above mentioned WHO mouse NVT is a key test for monitoring the consistency of vaccine production (Wood & Macadam, 1997, Biologicals), and following WHO guidelines is required for each monovalent bulk lot of OPV produced. The WHO NVT (WHO, 1990, WHO Technical Report Series, No.800) is a standardized procedure. If consecutive lots of OPV bulks consistently meet the specifications of the WHO test, there is a high level of assurance that the vaccines will be safe when used for human immunizations (Contreras et al., 1988, J Biol Stand; Furesz & Contreras, 1993, Dev Biol Stand).

Based on the above, the WHO mouse NVT is also selected to screen the stool samples generated in a clinical trial to assess safety and efficacy of genetically stable new generation OPV formulations for the presence of neurovirulent polioviruses. As explained, reversion to wild-type would occur in the human gut (of a volunteer in a clinical trial) and to check for this human stool samples are processed in such a way that the material can be inoculated intraspinally into ████████ transgenic mice, which will then be monitored, like for the direct testing of a vaccine preparation, for neurological signs.

Summary of test articles:

- Classical OPV batches (monovalent, bivalent, trivalent);
- New generation OPV (monovalent, bivalent, trivalent);
- Stool samples from clinical trials (indirect vaccine safety assessment).

The present project proposal includes also training modules that describe procedures to master the intraspinal inoculation procedure in mice (both conventional and [REDACTED] mice) that are required to be able to perform the NVT in the transgenic mouse model.

The WHO has determined that the initial training can only be provided by the [REDACTED] ([REDACTED]). The applicant is in good contact with [REDACTED].

Training as well as testing procedures described in the project proposal and the accompanying animal procedure appendices are all taken from the WHO SOP (WHO SOP for neurovirulence testing of Oral Polio Vaccine using [REDACTED] transgenic mice).

### **The applicant**

In the context of the development of vaccine and antiviral formulations against viral infections, the applicant offers various preclinical models that allow testing of these formulations. Once established, these models are subsequently made available to third parties (pharmaceutical companies, academia) to test newly developed vaccines and/or antiviral formulations. These parties use the expertise of the applicant to select the relevant preclinical model that allows appropriate testing of their preparations. In the current project proposal, the applicant is aiming to establish poliovirus vaccine safety testing procedures according to existing WHO procedures.

Admission of newly developed medicines (including vaccines) to the European markets requires following a regulatory path in order to obtain formal registration of these products for human use. For European markets, information on these procedures is available through the EMA (European Medicines Agency). Part of the regulatory path to registration are clinical trials in which safety and efficacy of the products in development are assessed. The design of these clinical trials is described in EU clinical trials Directive 2001/20/EC.

The required training (secondary objective; module 1 and 2) will only commence when a vaccine/stool sample project has been assigned to the applicant in order to circumvent unnecessary (repeat of) training.

---

### **3.2 Purpose**

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

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

The objectives are twofold:

1. Determination of the safety profile of OPV vaccine formulations directly and indirectly by stool sample analysis in the context of clinical trials
2. Training of inoculators and clinical observers to master the intraspinal inoculation technique and the [REDACTED] NVT

The primary objective (#1), which is described in module 3, is to determine the safety profile of OPV vaccine formulations directly and indirectly by stool sample analysis in order to assess the neurovirulence of polioviruses secreted by volunteers enrolled in a clinical trial using the [REDACTED] methodology. This objective is achievable after successful completion of training modules 1 and 2, described in this project as secondary objective.

The applicant has ample experience in several mouse models of viral infections, including influenza, respiratory syncytial virus, and rabiesvirus. Several of these models involve scoring of clinical signs similar to those that are associated with neurovirulent poliovirus infection of mice.

The secondary objective (#2) is addressed in modules 1 and 2 that describe training and qualification of

---

inoculators to perform the intraspinal inoculation technique that allows subsequent training and qualification on the [REDACTED] NVT according to WHO guidelines as laid down in the WHO SOP also in terms of proper clinical scoring.

This objective is achievable since preliminary training through an external program that is provided by the WHO accredited [REDACTED] in the UK has been completed for the first trainees in the applicant's program. Because in the case of a long period of inoculating and scoring inactivity (greater than 6 months) a requalification of the biotechnicians is required according to the WHO protocol, the training (objective 1) will only commence when a vaccine/stool sample project has been assigned to the applicant in order to circumvent unnecessary (repeat of) training

---

### 3.3 Relevance

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

Global eradication of polio was initiated in 1988 (350.000 reported cases in 125 countries) and has seriously diminished infection numbers and disease burden up until 2002. However, due to a complex combination of factors (including political, economical, etc.) this program was challenged and the annually reported number of polio cases increased between 2002 and 2006 (WHO bulletin 2007). The eradication program was subsequently modified and intensified: The Global Polio Eradication Initiative (GPEI) is a public-private partnership led by national governments and spearheaded by the World Health Organization (WHO), Rotary International, the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC), and the United Nations Children's Fund (UNICEF). Its goal is to eradicate polio worldwide, the strategy of which is laid down in the Polio Eradication and Endgame Strategic Plan 2013–2018. Failure to eradicate now would result in 200.000 annual polio cases within 5 years and an estimated global burden of 50 billion dollars over a 20 year period (GPEI Report).

The OPV formulations that will be tested directly and indirectly in the present project will be used in the Polio Eradication and Endgame Strategic Plan in reaching the goal of GPEI: global eradication of poliovirus, because the WHO mouse NVT must be passed for the release of OPVs for human use.

---

### 3.4 Research strategy

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

Within the GPEI program for global eradication of polio, both classical as well as newly developed (more genetically stable) polio vaccine formulations designed to focus on eradication of polioviruses include monovalent, bivalent and trivalent OPV preparations. One such bivalent OPV (bOPV) is currently being tested in clinical trials. The safety testing program includes screening for the occurrence of vaccine strains that revert to neurovirulence. This will be addressed through the analysis of stool samples isolated from bOPV inoculated volunteers for the presence of these revertant polioviruses. The applicant will employ the mouse model established by the WHO for this purpose. The current project which enables these analyses includes training of personnel in order to qualify them to perform the analysis according to WHO procedures.

As testing for vaccine virus revertants to wild type poliovirus was chosen to be assessed through the [REDACTED] NVT procedure, inoculators first have to be trained to master the technique, which is addressed in Modules 1 and 2. Preliminary training involves an external program that is provided by the WHO accredited [REDACTED] in the UK. This preliminary training is also described in the WHO SOP and involves attending the inoculation procedure as performed by qualified personnel, training on clinical scoring of inoculated mice and on analyses methods that are part of the procedure. Upon completion of the preliminary training, trainees are prepared for Modules 1 and 2. This preliminary training has been completed recently by the first trainees of the applicant's program.

---

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

- Module 1. Training of inoculators using conventional mice.  
Animal procedures: weighing, intraspinal inoculation of indian ink under sedation, euthanasia.
- Module 2. Training of inoculators using [REDACTED] mice.  
Animal procedures: weighing, intraspinal inoculation of poliovirus containing materials under sedation, daily scoring of clinical signs, euthanasia.
- Module 3. Testing of OPV batches and stool samples from clinical trials for OPV safety assessment  
Animal procedures: weighing, intraspinal inoculation of poliovirus containing materials under sedation, daily scoring of clinical signs, euthanasia.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

- Module 1. Training of inoculators using conventional mice.  
Training of personnel on the intraspinal inoculation procedure to achieve competence. For this purpose conventional mice can be used. Competence is achieved and the inoculator is allowed to continue with training in Module 2 when  $\geq 90\%$  accuracy is obtained in three consecutive tests.
- Module 2. Training of inoculators using [REDACTED] mice.  
Continued training of inoculators on intraspinal inoculation of WHO reference materials containing poliovirus serotypes 1 and 3. In addition, clinical scoring of inoculated mice for development of poliovirus disease (paresis and/or paralysis) is recorded to allow assessment of competence according to WHO guidelines. Qualified personnel is allowed to perform the studies of Module 3.
- Module 3. Testing of OPV batches and stool samples from clinical trials for OPV safety assessment.  
In this module, OPV batches and polioviruses secreted by volunteers enrolled in a clinical trial to assess the safety of a OPV preparation are tested for neurovirulence using the [REDACTED] methodology and personnel trained in Modules 1 and 2.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Module 1. Training of inoculators using conventional mice
2	Module 2. Training of inoculators using [REDACTED] mice
3	Module 3. Testing of OPV batches and stool samples from clinical trials for OPV safety assessment
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure                                  |
|---------------|---|
| 1             | Module 1. Training of inoculators using conventional mice |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

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

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

Preliminary training on evaluation of inoculation procedures, will be carried out in coordination with the ██████ in the UK.

The training procedure is described in and the information provided below is taken from Appendix 2 of the WHO SOP for neurovirulence testing of Oral Polio Vaccine using ██████ transgenic mice, which describes the recommended training program.

In this module, technicians are trained to perform the intraspinal inoculation procedure on conventional mice. In this training program, the inoculation procedure will be performed using Indian Ink in a series of tests involving at least ██████ mice each. Primary readout parameter is Indian Ink distribution as determined by post-mortem analysis of (portions of) the spinal cord. According to the WHO SOP, a trainee is considered competent to pass to the next stage of the training (Module 2) if  $\geq 90\%$  of animals are inoculated correctly in each of 3 consecutive tests.

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

The animal procedures are taken/adapted from the WHO SOP.

In this training program the same procedures are used as for the standard NVT, but instead of vaccine, a 10% Indian ink solution (non-toxic and non-irritating, commercially available) is injected to check placement of the needle and assess the extent of diffusion of injected material.

- After delivery of the mice and an acclimatization period of at least 7 days, the animals are weighed, individually marked and their backs are shaved to facilitate inoculation.



- Next, the animals are anesthetized using a mixture of ketamine/medetomidine (10, resp. 0.4 mg/ml) that will be applied intraperitoneally (i.p.) in a volume between 0.3 and 0.4 ml depending on the weight of the animal.
- After disinfection of the skin a longitudinal incision is made over the thoracic-lumbar regions of the spine.
- Needles and microsyringes will be used according to the specifications of the WHO SOP.
- Spinal inoculation is performed by inserting the needle between the spinous processes of the last thoracic and the first lumbar vertebrae and advancing into the substance of the spinal cord according to the detailed directions described in the SOP.
- Correct needle placement is verified through observation of jerking of one or both hind legs.
- Upon observation of a jerk reaction, 5µl of a 10% Indian ink solution is injected slowly (2 to 5 seconds duration). During injection, jerking of hind legs should be observed.
- Directly after inoculation (within max 5 minutes and while the animal is still under anaesthesia), the animals will be euthanized and the spinal cord will be removed for assessment of inoculation through analysis of the Indian ink distribution.

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

A test size of at least [ ] animals is required according to the WHO SOP.

### B. The animals

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

Species: ICR mice.

Origin: Registered breeder.

Estimated numbers: The WHO SOP requires at least [ ] mice per test to be used. According to information provided in the SOP, in order for an inoculator to become competent to perform the procedure ( $\geq 90\%$  accuracy in 3 consecutive tests), experience indicates that up to 20 tests may be required. This means [ ] mice may be required to train one inoculator. Since training of 8 inoculators is estimated to be required to meet the demands for testing in Module 3, [ ] mice are estimated to be required for this module for training purposes. The actual number of people that will be trained will be carefully determined and will be in line with the amount of work in order to keep the numbers of mice required for training as low as possible. A realistic size of a first project would be the testing of 300 samples, which means that over a non-stop period of about 60 weeks three inoculators will have inoculation events twice a week. Realistically, one inoculator could inoculate not more than [ ] mice per day (it has been determined that [ ] Tg mice have to be used for the analysis of one stool sample). Taken together, also in light of continuity, for a project which involves the testing of [ ] samples, at least [ ] people with have to be trained as inoculator.

The WHO SOP dictates that this procedure is also used for Maintenance of Competence of qualified personnel: if a qualified inoculator has not completed a test within the previous 3 months they should validate their technique by completing a series of intraspinal inoculations with India ink. Failure to achieve  $\geq 90\%$  in a single test with [ ] animals requires performing the India ink inoculation phase until  $\geq 90\%$  accuracy is reached on three consecutive runs. Additionally, each qualified inoculator shall perform a minimum of one India ink inoculation procedure per year. This maintenance program is estimated to require a total of [ ] animals per year, a total of [ ] for the project running time of 5 years.

Life stages:  $\geq 6$  weeks of age, according to the WHO SOP.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

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

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

##### **Replacement**

Currently, there is no *in vitro* test available for neurovirulence testing of poliovirus (vaccine) strains. The monkey NVT has largely been displaced by the [REDACTED] NVT. In order to train personnel on the intraspinal inoculation procedure, the use of live mice is unavoidable as (training of) the procedure depends on observations that can only be made in live animals.

##### **Reduction**

The number of animals to be used in each test ([REDACTED]) is dictated by the WHO SOP, use of lower numbers would jeopardize the objective of the module, i.e. training of inoculators. Proper preliminary training at the [REDACTED] should allow reduction of the number of tests required for a specific trainee to reach competence.

##### **Refinement**

The ICR mouse will be used for this module as this is the strain that was used to generate the [REDACTED] strain of mice that is to be used in Modules 2 and 3 of the project.

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

Animals will be anesthetized throughout the procedure and euthanized after completion of the procedure. Procedures and equipment to be used will be selected according the WHO SOP in order to minimise animal suffering. No adverse effects on the environment are expected from these training procedures. The studies will be performed in facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

Repetition is required to train inoculators to be able to adequately perform the [REDACTED] NVT on stool samples from volunteers inoculated with a new bOPV formulation (Module 3).

### **Accommodation and care**

#### **F. Accommodation and care**

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and

treatment of the animals will be ensured.

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The animals are anesthetized throughout the procedure.

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

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

Not applicable as the animals will be euthanized at the end of the procedure.

Explain why these effects may emerge.

n.a.

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

n.a.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

### K. Classification of severity of procedures

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

Non-recovery, the animals are euthanized immediately after completion of the inoculation procedure.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

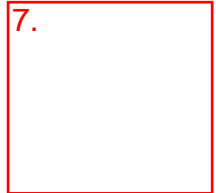
The spinal cord is to be removed after euthanization in order to assess accuracy of the inoculation procedure.

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

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

Yes

---



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.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             | Module 2. Training of inoculators using <input type="text" value=""/> mice |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

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

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

Preliminary training on evaluation of inoculation procedures, clinical scoring, documentation and analyses will be carried out in coordination with the  in the UK. Module 1 describes training of the inoculation procedure using Indian ink in conventional mice. When competence of the trainee has been established in Module 1, training continues according to the procedures described in the current module. The training procedure is described in and the information provided below is taken from Appendix 2 of the WHO SOP for neurovirulence testing of Oral Polio Vaccine using  transgenic mice, which describes the recommended training program.

In this module, technicians are trained to perform the intraspinal inoculation procedure on  mice. In this training program, the inoculation procedure will be performed using WHO polio reference materials in multiple doses in a series of tests involving  mice per dose per gender[\*] for each strain. The primary readout parameter is scoring of behavioral/clinical observations after inoculation of standardised WHO reference materials. Acceptance/validity criteria have been defined and are described in detail in the WHO SOP.

mice are transgenic mice carrying a human receptor to poliovirus. Female and male mice show similar expression levels of the receptor but the sensitivity for poliovirus seems slightly different. Male transgenic mice are more likely to develop poliomyelitis than female mice and a higher proportion of males than females die after developing paralysis. Epidemiology studies in humans suggest the same phenomenon; i.e., human males are more susceptible than females to enteroviruses, especially polioviruses (with a male:female ratio between 1.5:1 and 2.5:1, respectively). Therefore, all the developmental studies for the optimization of this WHO mouse NVT are performed with equal numbers of male and female mice (determined in the official SOP) to capture this natural variation and the advantage of doing so is that there will not be a surplus of one or the other sexes].

In the WHO SOP, the training on [REDACTED] mice consists of two independent tests for each of serotypes 1, 2 and 3 (6 tests in total). An organization need only complete the training tests for each serotype once. Training of subsequent inoculators will involve a reduced set of 3 tests, the schedule of which should be agreed with the WHO affiliated reference laboratory.

The first trainee of an institution needs to meet these criteria for each of the two independent tests to be performed for each poliovirus reference strain. As the stool samples to be tested in Module 3 are obtained from volunteers vaccinated with a bOPV vaccine containing poliovirus serotypes 1 and 3, the training will only be performed using WHO reference materials for these strains and therefore a series of 4 tests needs to be completed.

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

The animal procedures are taken/adapted from the WHO SOP.

#### Intraspinal inoculation

- After delivery of the mice and an acclimatization period of at least 7 days, the animals are weighed, individually marked, randomized according to procedures described in detail in the WHO SOP.
- Prior to inoculation of the test materials, their backs are shaved to facilitate inoculation.
- Next, the animals are anesthetized using a mixture of ketamine/medetomidine (10, resp. 0.4 mg/ml) that will be applied intraperitoneally (i.p.) in a volume between 0.3 and 0.4 ml depending on the weight of the animal.
- After disinfection of the skin a longitudinal incision is made over the thoracic-lumbar regions of the spine.
- Needles and microsyringes will be used according to the specifications of the WHO SOP.
- Spinal inoculation is performed by inserting the needle between the spinous processes of the last thoracic and the first lumbar vertebrae and advancing into the substance of the spinal cord according to the detailed directions described in the SOP.
- Correct needle placement is verified through observation of jerking of one or both hind legs.
- Upon observation of a jerk reaction, 5µl of test material is injected slowly (2 to 5 seconds duration). During injection, jerking of hind legs should be observed.
- Following inoculation the skin incision is closed with a suitable adhesive or by alternative means.
- Ophthalmic ointment will be applied to each eye to prevent desiccation of the cornea.

#### Clinical observations

- Inoculated animals will be observed for neurological signs of disease at least once per day for 14 days. The clinical stage will be recorded for each individual mouse. Four clinical stages have been defined based on characteristic motor signs:

Table taken from the WHO SOP. Clinical stages of disease used for daily scoring.

Stages	Physical signs		
<b>Normal</b>	Grips the edge of the cage	Walks normally on the grid and on a flat surface	Full ability to move limbs forward
<b>Weak</b>	Unable to grip the edge of the cage	Walks normally on a grid or flat surface	Full ability to move limbs forward
<b>Paresis/Partial paralysis</b>	Unable to grip the edge of the cage	Limb falls through the grid more than once while walking steadily forward and/or toes curl repeatedly while walking on a flat surface	At least a partial ability to move limb forward
<b>Paralysis</b>	Unable to grip the edge of the cage	No use of limb on grid or flat surface	Inability to move the limb forward

- In borderline cases where it difficult to decide between stages, the lower score is assigned, because here the term "borderline" is not used for uncertainty about welfare/un-welfare of the animal; two consecutive borderline decisions with the higher score (paresis/paralysis) as outcome would have

significant impact on the interpretation of the data with possible false rejection of a life-saving vaccine batch. Therefore, WHO SOP describes that only the advanced motor disorders of paresis and paralysis can be considered as reliable stages for determining the acceptability of a test vaccine. At the end of the test, on day 14, the animal should be scored as either Normal (0) or Paralyzed (1). The latter are defined as those that:

1. Showed a paralysis clinical score in any limb
  2. Showed a paresis clinical score on 2 consecutive days
- Animals which are scored as paresis on 2 consecutive days or paralysis for one day may be euthanized (humane endpoints, see J)
  - All surviving animals will be euthanized on day 14.
  - Collected data are submitted to the WHO affiliated reference laboratory for assessment.

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

For each reference test material, a test size of [ ] animals per dose per gender is required according to the WHO SOP.

### **B. The animals**

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

Species: [ ] mice.

Origin: Registered breeder.

Estimated numbers: The WHO SOP requires [ ] mice/dose/gender to be used, therefore per trainee the training for one strain requires at least:

[ ] mice x 2 (#independent tests) x 2 (#dose) x 2 (#gender) = [ ] mice per reference material to be used.

To complete training for serotypes 1 and 3, this means at least [ ] mice are required to train one inoculator. Since training of subsequent inoculators requires a reduced number of 3 tests, these subsequent trainings require at least ( [ ] ) = [ ] mice. For 7 additional trainees the estimated number of required mice is at least [ ] = [ ] . In all cases the applicant will determine very carefully how many people will have to be trained in order to get a project assigned and for the continuity. Criteria for invalidity and repeat tests have been defined and are provided in the WHO SOP and are assumed to require [ ] mice (see also I).

Adding up the numbers above and assuming three re-tests per serotype per inoculator trainee ( [ ] ) the total estimated number of animals to be used for this module is ( [ ] = ) [ ] .

Life stages: ≥ 6 weeks of age, according to the WHO SOP.

### **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

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

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

#### **Replacement**

Currently, there is no *in vitro* test available for neurovirulence testing of poliovirus (vaccine) strains. The monkey NVT has largely been displaced by the [ ] NVT. In order to train personnel on the intraspinal inoculation procedure, the use of live mice is unavoidable as (training of) the procedure

depends on observations that can only be made in live animals.

### **Reduction**

The number of animals to be used in each test is dictated by the WHO SOP, use of lower numbers would jeopardize the objective of the module, i.e. training of inoculators. The number of animals are determined by careful statistical analysis based on data obtained from many developmental studies for the optimization of the protocol. Proper preparatory training at the [REDACTED] and in Module 1 should allow reduction of the number of tests required for a specific trainee to reach competence.

### **Refinement**

An important refinement factor lies in the fact the whole procedure is described in detail in a standard operating procedure (SOP) of the WHO, the quality is assured by the use of standard virus preparations, the mice can only be obtained from a supplier assigned by WHO and the training of personnel is solely in the hands of [REDACTED].

In the past decades several different strains of mice transgenic for the poliovirus receptor have been generated showing different expression levels of the poliovirus receptor in different compartments (central nervous system, digestive tract). The [REDACTED] mouse has been designated by WHO as the most suitable strain and will be used for this module This strain of mice will also be used in Module 3 of the project.

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

Animals will be anesthetized throughout the inoculation procedure. Humane endpoints for the follow-up period in which the animals may develop clinical signs of paresis and/or paralysis have been defined in order to minimise suffering (see J).

Procedures and equipment to be used will be selected according the WHO SOP in order to minimise animal suffering. No adverse effects on the environment are expected from these training procedures. The studies will be performed in DM-II facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

## **Repetition and duplication**

### **E. Repetition**

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

Repetition is required to train inoculators to be able to adequately perform the [REDACTED] NVT on stool samples from volunteers inoculated with a new bOPV formulation (Module 3).

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and



treatment of the animals will be ensured.

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The animals are anesthetized throughout the inoculation procedure. For the post-inoculation 14 day follow-up period, humane endpoints have been defined (see below). Post-operative analgesia will not be applied because there is a very minimal risk for pain from the operation wound and paresis and paralysis are not associated with pain. Analgesia would not be necessary and when it would be applied it could obscure/interfere with the read out of the model.

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

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

The following adverse effects that impair the animals' welfare are described in the WHO SOP and can be expected to occur.

1. Death due to anesthesia, normally resulting in the animal not recovering from inoculation;
2. Death due to inoculation trauma;
3. Animals that show traumatic paresis/paralysis that appears within 24 hours after the inoculation where the paralysis does not progress. This is not applicable in cases where the animal recovers after the initial trauma. In this case the animal is scored according to the normal procedure.
4. Injury or death (worst case) as a direct result of fighting or injury;
5. Other non-identified causes of death where a relationship with poliovirus clinical progression is not evident;

Of note, this Module 2 describes the training required to optimize the skills of the inoculator so that this person is able to perform the actual NVT (Module 3). This training is also meant to reduce the change that a test would have to be repeated. If more than 5% of animals are excluded for the reasons noted above the test should be repeated.

Explain why these effects may emerge.

See above.

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

For each of the above described adverse effects, the following measures are available:

1. Anesthesia is carefully dosed according to weight (see A)
2. Use of personnel trained and qualified for the inoculation procedure in Module 1. Severity is minimised by euthanasia of severely traumatized animals.
3. Use of personnel trained and qualified for the inoculation procedure in Module 1.
4. Daily observations and individual housing of animals when necessary. Euthanasia in case of severe injuries considered to be lethal, as judged by trained personnel.

N.A. Post-mortem analysis will be performed, this may result in identification of potential preventive measures.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

[same numbering as used in "I" and "J"]

1. not applicable (very acute, death under anesthesia);
2. The WHO SOP describes the inoculation procedure in detail with great attention for animal welfare aspects. Briefly, if the needle is inserted into the correct position, one or both hind legs should jerk. The number of attempted needle insertions will not exceed three. Once a jerk reaction is observed, the sample is injected slowly over a period of 2 to 5 seconds to minimize pressure caused by the entry of the injection volume while avoiding mechanical trauma caused by needle movement. The injection may be conducted by either one or two persons depending on whether one person can simultaneously position the needle and push the syringe plunger with ease. Where this proves difficult, or where the number of animals with mechanical inoculation trauma is high, a second person should be employed to push the plunger while the needle is held firmly in place by the first. During injection of the test material mice should exhibit jerks of the hind legs, and in some cases, twisting of the rear half of the body may be observed.

If the mouse is showing abnormal reflexes the mouse will be euthanized directly while still being under anesthesia

3. If the paralysis does progress the mouse will be euthanized.
4. The injury will be evaluated and if the injury is not severe the mouse may be placed in a separate cage
5. If an animal would show clinical signs that can not be related to the treatment (inoculation or poliovirus infection) like respiratory distress, the animal will be euthanized.

Additional information adapted from the WHO SOP related to the poliovirus infection:

Animals that show a paralysis clinical score in any limb or a paresis clinical score on 2 consecutive days are considered to have reached a point of no return (humane endpoint) and will be euthanized.

Physical signs for paralysis are:

- Unable to grip the edge of the cage.
- No use of limb on grid (e.g. a cage lid) or flat surface.
- Inability to move the limb forward.

Physical signs for paresis are:

- Unable to grip the edge of the cage.
- Limb falls through the grid (e.g. a cage lid) more than once while walking steadily forward and/or toes curl repeatedly while walking on a flat surface.
- At least a partial ability to move limb forward.

Indicate the likely incidence.

Depending on the neurovirulence of the WHO reference materials that will be used for inoculation and the available information on the use of those strains in a multi-laboratory study (Dragunsky et al., Bulletin of the WHO, 2003), the incidence is summarized in the following table:

Reference material	Incidence	
	Low dose	High dose
WHO/I (serotype 1)	up to 31%	up to 94%
WHO/III (serotype 3)	up to 57%	up to 97%

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

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

Intraspinal inoculation: moderate

Clinical follow-up period: moderate due to the application of humane endpoints

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

As these animals have been infected with poliovirus, they cannot be used for other purposes.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 90500
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. BioXpert
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure   |
|---------------|--|
| 3             | Module 3. Testing of stool samples from clinical trials for bOPV safety assessment |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

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

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

After training in Modules 1 and 2, inoculators will now be used to analyse stool samples from volunteers inoculated with a new bOPV formulation in the context of a clinical trial. Analysis is aimed at determining the neurovirulence of vaccine virus that is secreted in faeces. Upon purification by chloroform extraction, samples of these test materials will be intraspinally inoculated and assessed against reference materials for the occurrence of clinical signs using a clinical scoring system (primary readout parameter). The involved procedures are described in and the information provided below is taken from the WHO SOP for neurovirulence testing of Oral Polio Vaccine using ████████ transgenic mice.

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

The animal procedures are taken/adapted from the WHO SOP.

##### Intraspinal inoculation

- After delivery of the mice and an acclimatization period of at least 7 days, the animals are weighed, individually marked, randomized according to procedures described in detail in the WHO SOP.
- Prior to inoculation of the test materials, their backs are shaved to facilitate inoculation.
- Next, the animals are anesthetized using a mixture of ketamine/medetomidine (10, resp. 0.4 mg/ml) that will be applied intraperitoneally (i.p.) in a volume between 0.3 and 0.4 ml depending on the weight of the animal.
- After disinfection of the skin a longitudinal incision is made over the thoracic-lumbar regions of the spine.

- Needles and microsyringes will be used according to the specifications of the WHO SOP.
- Spinal inoculation is performed by inserting the needle between the spinous processes of the last thoracic and the first lumbar vertebrae and advancing into the substance of the spinal cord according to the detailed directions described in the SOP.
- Correct needle placement is verified through observation of jerking of one or both hind legs.
- Upon observation of a jerk reaction, 5µl of test material is injected slowly (2 to 5 seconds duration). During injection, jerking of hind legs should be observed.
- Following inoculation the skin incision is closed with a suitable adhesive or by alternative means.
- Ophthalmic ointment will be applied to each eye to prevent desiccation of the cornea.

#### Clinical observations

- Inoculated animals will be observed for neurological signs of disease at least once per day for 14 days. The clinical stage will be recorded for each individual mouse. Four clinical stages have been defined based on characteristic motor signs:

Table taken from the WHO SOP. Clinical stages of disease used for daily scoring.

Stages	Physical signs		
<b>Normal</b>	Grips the edge of the cage	Walks normally on the grid and on a flat surface	Full ability to move limbs forward
<b>Weak</b>	Unable to grip the edge of the cage	Walks normally on a grid or flat surface	Full ability to move limbs forward
<b>Paresis/Partial paralysis</b>	Unable to grip the edge of the cage	Limb falls through the grid more than once while walking steadily forward and/or toes curl repeatedly while walking on a flat surface	At least a partial ability to move limb forward
<b>Paralysis</b>	Unable to grip the edge of the cage	No use of limb on grid or flat surface	Inability to move the limb forward

- In borderline cases where it difficult to decide between stages, the lower score is assigned, because here the term "borderline" is not used for uncertainty about welfare/un-welfare of the animal; two consecutive borderline decisions with the higher score (paresis/paralysis) as outcome would have significant impact on the interpretation of the data with possible false rejection of a life-saving vaccine batch. Therefore, WHO SOP describes that only the advanced motor disorders of paresis and paralysis can be considered as reliable stages for determining the acceptability of a test vaccine.
- At the end of the test, on day 14, the animal should be scored as either Normal (0) or Paralyzed (1). The latter are defined as those that:
  1. Showed a paralysis clinical score in any limb
  2. Showed a paresis clinical score on 2 consecutive days
- Animals which are scored as paresis on 2 consecutive days or paralysis for one day may be euthanized (humane endpoints, see J)
- All surviving animals will be euthanized on day 14.
- Collected data are subsequently used for statistical analysis as described in detail in the WHO SOP

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

40 animals are required for each test material, according to the WHO SOP adaptation to be used.

#### **B. The animals**

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

Species: XXXXXXXXXX mice.

Origin: Registered breeder.

Estimated numbers[\*]: The calculation is mainly based on the stool sample analysis rather than on the number of OPV batch testing, because the number of stool samples to be analysed will by far exceed the number of vaccine batches to be tested. In a first project about 300 stool samples are to be analysed, at

■■■ animals/sample ■■■■ animals will be required at least. Criteria for invalidity and repeat tests have been defined and are provided in the WHO SOP (see also I). Taking this into account and assuming a 15% retest rate, an estimated total of ■■■■ animals is required for this module.

For vaccine lot/batch testing ■■ mice are used per vaccine per dose (and a vaccine is tested at two doses). Vaccines could be tested as two test articles per run in comparison to one reference vaccine. We estimate that in the coming 5 years 20 OPVs will be evaluated for which ■■■■ animals are required.

Total estimated number: ■■■■

Life stages: ≥ 6 weeks of age, according to the WHO SOP.

[\*, this information is based on recent communication with the Sponsor of the project, who is consulting poliovirus experts of WHO, ■■■■; in the first project 100 volunteers will be included and 8 stool samples will be collected per volunteer. First the viral load is determined by PCR and virus titration. Poliovirus positive samples are then sequenced and it is estimated that in 300 samples mutations may be found and the WHO mouse NVT is then used to determine whether the genetic change is associated with a phenotypic change, i.e. neurovirulence].

---

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

---

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

No

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

---

### D. Replacement, reduction, refinement

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

#### Replacement

Currently, there is no *in vitro* test available for neurovirulence testing of poliovirus (vaccine) strains. The monkey NVT has largely been displaced by the ■■■■ NVT. In order to train personnel on the intraspinal inoculation procedure, the use of live mice is unavoidable as (training of) the procedure depends on observations that can only be made in live animals.

#### Reduction

The number of animals to be used in each test is dictated by the WHO SOP, use of lower numbers would jeopardize the objective of the module, i.e. training of inoculators. The number of animals are determined by careful statistical analysis based on data obtained from many developmental studies for the optimization of the protocol. Proper preparatory training at the ■■■■ and in Module 1 should allow reduction of the number of tests required for a specific trainee to reach competence.

#### Refinement

An important refinement factor lies in the fact the whole procedure is described in detail in a standard operating procedure (SOP) of the WHO, the quality is assured by the use of standard virus preparations, the mice can only be obtained from a supplier assigned by WHO and the training of personnel is solely in the hands of ■■■■.

In the past decades several different strains of mice transgenic for the poliovirus receptor have been generated showing different expression levels of the poliovirus receptor in different compartments (central nervous system, digestive tract). The ■■■■ mouse has been designated by WHO as the most suitable strain and will be used for this module This strain of mice will also be used in Module 3 of the project.

---

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

Animals will be anesthetized throughout the inoculation procedure. Humane endpoints for the follow-up period in which the animals may develop clinical signs of paresis and/or paralysis have been defined in order to minimise suffering (see J).

Procedures and equipment to be used will be selected according the WHO SOP in order to minimise animal suffering. No adverse effects on the environment are expected from these training procedures. The studies will be performed in DM-II facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

This is the first time this new OPV formulation will be tested for neurovirulence in stool samples obtained from inoculated volunteers in the context of a clinical trial. Furthermore, the evaluation of OPV batches will also involve unique testing unless under special circumstances peer reviewing is required.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The animals are anesthetized throughout the inoculation procedure. For the post-inoculation 14 day follow-up period, humane endpoints have been defined (see below). Post-operative analgesia will not be applied because there is a very minimal risk for pain from the operation wound and paresis and paralysis are not associated with pain. Analgesia would not be necessary and when it would be applied it could obscure/interfere with the read out of the model.

---

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

---

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

---

The following adverse effects that impair the animals' welfare are described in the WHO SOP and can be expected to occur.

1. Death due to anesthesia, normally resulting in the animal not recovering from inoculation;
2. Death due to inoculation trauma;
3. Animals that show traumatic paresis/paralysis that appears within 24 hours after the inoculation where the paralysis does not progress. This is not applicable in cases where the animal recovers after the initial trauma. In this case the animal is scored according to the normal procedure.
4. Injury or death (worst case) as a direct result of fighting or injury;
5. Other non-identified causes of death where a relationship with poliovirus clinical progression is not evident;

Of note, this Module 2 describes the training required to optimize the skills of the inoculator so that this person is able to perform the actual NVT (Module 3). This training is also meant to reduce the change that a test would have to be repeated.

If more than 5% of animals are excluded for the reasons noted above the test should be repeated.

---

Explain why these effects may emerge.

---

See above.

---

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

---

For each of the above described adverse effects, the following measures are available:

1. Anesthesia is carefully dosed according to weight (see A)
  2. Use of personnel trained and qualified for the inoculation procedure in Module 1. Severity is minimised by euthanasia of severely traumatized animals.
  3. Use of personnel trained and qualified for the inoculation procedure in Module 1.
  4. Daily observations and individual housing of animals when necessary. Euthanasia in case of severe injuries considered to be lethal, as judged by trained personnel.
  5. N.A. Post-mortem analysis will be performed, this may result in identification of potential preventive measures.
- 

**J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

---

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

---

[same numbering as used in "I" and "J"]

1. not applicable (very acute, death under anesthesia);
2. The WHO SOP describes the inoculation procedure in detail with great attention for animal welfare aspects. Briefly, if the needle is inserted into the correct position, one or both hind legs should jerk. The number of attempted needle insertions will not exceed three. Once a jerk reaction is observed, the sample is injected slowly over a period of 2 to 5 seconds to minimize pressure caused by the entry of the injection volume while avoiding mechanical trauma caused by needle movement. The injection may be conducted by either one or two persons depending on whether one person can simultaneously position the needle and push the syringe plunger with ease. Where this proves difficult, or where the number of animals with mechanical inoculation trauma is high, a second person should be employed to push the plunger while the needle is held firmly in place by the first. During injection of the test material mice should exhibit jerks of the hind legs, and in some cases, twisting of the rear half of the body may be observed.

If the mouse is showing abnormal reflexes the mouse will be euthanized directly while still being under anesthesia

3. If the paralysis does progress the mouse will be euthanized.
  4. The injury will be evaluated and if the injury is not severe the mouse may be placed in a separate
-



cage

5. If an animal would show clinical signs that can not be related to the treatment (inoculation or poliovirus infection) like respiratory distress, the animal will be euthanized.

Additional information adapted from the WHO SOP related to the poliovirus infection:

Animals that show a paralysis clinical score in any limb or a paresis clinical score on 2 consecutive days are considered to have reached a point of no return (humane endpoint) and will be euthanized.

Physical signs for paralysis are:

- Unable to grip the edge of the cage.
- No use of limb on grid (e.g. a cage lid) or flat surface.
- Inability to move the limb forward.

Physical signs for paresis are:

- Unable to grip the edge of the cage.
- Limb falls through the grid (e.g. a cage lid) more than once while walking steadily forward and/or toes curl repeatedly while walking on a flat surface.
- At least a partial ability to move limb forward.

Indicate the likely incidence.

As there is no information available on the neurovirulence of virus present in the stool samples of volunteers vaccinated with the bOPV formulation that is being analysed, incidence rates are considered likely to be equal to WHO reference materials at most. Depending on the neurovirulence of the WHO reference materials that will be used for inoculation and the available information on the use of those strains in a multi-laboratory study (Dragunsky et al., Bulletin of the WHO, 2003), the incidence is summarized in the following table:

Reference material	Incidence	
	Low dose	High dose
WHO/I (serotype 1)	up to 31%	up to 94%
WHO/III (serotype 3)	up to 57%	up to 97%

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

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

Intraspinal inoculation: moderate

Clinical follow-up period: moderate due to the application of humane endpoints

### **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

As these animals have been infected with poliovirus, they cannot be used for other purposes.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure                                  |
|---------------|---|
| 1             | Module 1. Training of inoculators using conventional mice |
- Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

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

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

Preliminary training on evaluation of inoculation procedures, will be carried out in coordination with the [REDACTED] in the UK.

The training procedure is described in and the information provided below is taken from Appendix 2 of the WHO SOP for neurovirulence testing of Oral Polio Vaccine (OPV) using [REDACTED] transgenic mice (Tg mice), which describes the recommended training program.

In this module, technicians are trained to perform the intraspinal inoculation procedure on conventional mice. In this training program, the inoculation procedure will be performed using Indian Ink in a series of tests involving at least [REDACTED] mice each. Primary readout parameter is Indian Ink distribution as determined by post-mortem analysis of (portions of) the spinal cord. According to the WHO SOP, a trainee is considered competent to pass to the next stage of the training (Module 2) if  $\geq 90\%$  of animals are inoculated correctly in each of 3 consecutive tests.

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

The animal procedures are taken/adapted from the WHO SOP.

In this training program the same procedures are used as for the standard NVT, but instead of vaccine, a 10% Indian ink solution (non-toxic and non-irritating, commercially available) is injected to check placement of the needle and assess the extent of diffusion of injected material.

- After delivery of the mice and an acclimatization period of at least 7 days, the animals are weighed, individually marked and their backs are shaved to facilitate inoculation.

- Next, the animals are anesthetized using a mixture of ketamine/medetomidine (10, resp. 0.4 mg/ml) that will be applied intraperitoneally (i.p.) in a volume between 0.3 and 0.4 ml depending on the weight of the animal.
- After disinfection of the skin a longitudinal incision is made over the thoracic-lumbar regions of the spine.
- Needles and microsyringes will be used according to the specifications of the WHO SOP.
- Spinal inoculation is performed by inserting the needle between the spinous processes of the last thoracic and the first lumbar vertebrae and advancing into the substance of the spinal cord according to the detailed directions described in the SOP.
- Correct needle placement is verified through observation of jerking of one or both hind legs.
- Upon observation of a jerk reaction, 5µl of a 10% Indian ink solution is injected slowly (2 to 5 seconds duration). During injection, jerking of hind legs should be observed.
- Directly after inoculation (within max 5 minutes and while the animal is still under anaesthesia), the animals will be euthanized and the spinal cord will be removed for assessment of inoculation through analysis of the Indian ink distribution.

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

A test size of at least [ ] animals is required according to the WHO SOP.

### B. The animals

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

Species: male and female (50/50) ICR mice.

Origin: Registered breeder.

Estimated numbers: The WHO SOP requires at least [ ] mice per test to be used. According to information provided in the SOP, in order for an inoculator to become competent to perform the procedure ( $\geq 90\%$  accuracy in 3 consecutive tests), experience indicates that up to 20 tests may be required. This means [ ] mice may be required to train one inoculator. Since training of 8 inoculators is estimated to be required to meet the demands for testing in Module 3, [ ] mice are estimated to be required for this module for training purposes. The actual number of people that will be trained will be carefully determined and will be in line with the amount of work in order to keep the numbers of mice required for training as low as possible. A realistic size of a first project would be the testing of [ ] samples, which means that over a non-stop period of about 60 weeks three inoculators will have inoculation events twice a week. Realistically, one inoculator could inoculate not more than [ ] mice per day (it has been determined that [ ] Tg mice have to be used for the analysis of one stool sample). Taken together, also in light of continuity, for a project which involves the testing of [ ] samples, a minimum of four people, but preferably eight people because of the intensive and laborious aspect of the biotechnical work, will have to be trained as inoculator.

The WHO SOP dictates that this procedure is also used for Maintenance of Competence of qualified personnel: if a qualified inoculator has not completed a test within the previous 3 months they should validate their technique by completing a series of intraspinal inoculations with India ink. Failure to achieve  $\geq 90\%$  in a single test with [ ] animals requires performing the India ink inoculation phase until  $\geq 90\%$  accuracy is reached on three consecutive runs. Additionally, each qualified inoculator shall perform a minimum of one India ink inoculation procedure per year. This maintenance program is estimated to require a total of [ ] animals per year, a total of [ ] for the project running time of 5 years.

Life stages:  $\geq 6$  weeks of age, according to the WHO SOP.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

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

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

##### **Replacement**

Currently, there is no *in vitro* test available for neurovirulence testing of poliovirus (vaccine) strains. The monkey NVT has largely been displaced by the [REDACTED] NVT. In order to train personnel on the intraspinal inoculation procedure, the use of live mice is unavoidable as (training of) the procedure depends on observations that can only be made in live animals.

##### **Reduction**

The number of animals to be used in each test ([REDACTED]) is dictated by the WHO SOP, use of lower numbers would jeopardize the objective of the module, i.e. training of inoculators. Proper preliminary training at the [REDACTED] should allow reduction of the number of tests required for a specific trainee to reach competence.

##### **Refinement**

The ICR mouse will be used for this module as this is the strain that was used to generate the [REDACTED] strain of mice that is to be used in Modules 2 and 3 of the project.

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

Animals will be anesthetized throughout the procedure and euthanized after completion of the procedure. Procedures and equipment to be used will be selected according the WHO SOP in order to minimise animal suffering. No adverse effects on the environment are expected from these training procedures. The studies will be performed in facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

Repetition is required to train inoculators to be able to adequately perform the [REDACTED] NVT on stool samples from volunteers inoculated with a new OPV formulation (Module 3).

### **Accommodation and care**

#### **F. Accommodation and care**

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The animals are anesthetized throughout the procedure.

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

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

Not applicable as the animals will be euthanized at the end of the procedure.

Explain why these effects may emerge.

n.a.

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

n.a.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

### K. Classification of severity of procedures

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

Non-recovery, the animals are euthanized immediately after completion of the inoculation procedure.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The spinal cord is to be removed after euthanization in order to assess accuracy of the inoculation procedure.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	90500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	BioXpert	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.  <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3	Module 3. Testing of stool samples from clinical trials for OPV safety assessment

#### 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.

After training in Modules 1 and 2, inoculators will now be used to analyse stool samples from volunteers inoculated with a new Oral Polio Vaccine (OPV) formulation in the context of a clinical trial. Analysis is aimed at determining the neurovirulence of vaccine virus that is secreted in faeces. Upon purification by chloroform extraction, samples of these test materials will be intraspinally inoculated and assessed against reference materials for the occurrence of clinical signs using a clinical scoring system (primary readout parameter).

The involved procedures are described in and the information provided below is taken from the WHO SOP for neurovirulence testing of OPV using ████████ transgenic mice.

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

The animal procedures are taken/adapted from the WHO SOP.

##### Intraspinal inoculation

- After delivery of the mice and an acclimatization period of at least 7 days, the animals are weighed, individually marked, randomized according to procedures described in detail in the WHO SOP.
- Prior to inoculation of the test materials, their backs are shaved to facilitate inoculation.
- Next, the animals are anesthetized using a mixture of ketamine/medetomidine (10, resp. 0.4 mg/ml) that will be applied intraperitoneally (i.p.) in a volume between 0.3 and 0.4 ml depending on the weight of the animal.
- After disinfection of the skin a longitudinal incision is made over the thoracic-lumbar regions of the

spine.

- Needles and microsyringes will be used according to the specifications of the WHO SOP.
- Spinal inoculation is performed by inserting the needle between the spinous processes of the last thoracic and the first lumbar vertebrae and advancing into the substance of the spinal cord according to the detailed directions described in the SOP.
- Correct needle placement is verified through observation of jerking of one or both hind legs.
- Upon observation of a jerk reaction, 5µl of test material is injected slowly (2 to 5 seconds duration). During injection, jerking of hind legs should be observed.
- Following inoculation the skin incision is closed with a suitable adhesive or by alternative means.
- Ophthalmic ointment will be applied to each eye to prevent desiccation of the cornea.

Clinical observations

- Inoculated animals will be observed for neurological signs of disease at least once per day for 14 days. The clinical stage will be recorded for each individual mouse. Four clinical stages have been defined based on characteristic motor signs:

Table taken from the WHO SOP. Clinical stages of disease used for daily scoring.

Stages	Physical signs		
<b>Normal</b>	Grips the edge of the cage	Walks normally on the grid and on a flat surface	Full ability to move limbs forward
<b>Weak</b>	Unable to grip the edge of the cage	Walks normally on a grid or flat surface	Full ability to move limbs forward
<b>Paresis/Partial paralysis</b>	Unable to grip the edge of the cage	Limb falls through the grid more than once while walking steadily forward and/or toes curl repeatedly while walking on a flat surface	At least a partial ability to move limb forward
<b>Paralysis</b>	Unable to grip the edge of the cage	No use of limb on grid or flat surface	Inability to move the limb forward

- In borderline cases where it difficult to decide between stages, the lower score is assigned, because here the term "borderline" is not used for uncertainty about welfare/un-welfare of the animal; two consecutive borderline decisions with the higher score (paresis/paralysis) as outcome would have significant impact on the interpretation of the data with possible false rejection of a life-saving vaccine batch. Therefor, WHO SOP describes that only the advanced motor disorders of paresis and paralysis can be considered as reliable stages for determining the acceptability of a test vaccine.
- At the end of the test, on day 14, the animal should be scored as either Normal (0) or Paralyzed (1). The latter are defined as those that:
  1. Showed a paralysis clinical score in any limb
  2. Showed a paresis clinical score on 2 consecutive days
- Animals which are scored as paresis on 2 consecutive days or paralysis for one day may be euthanized (humane endpoints, see J)
- All surviving animals will be euthanized on day 14.
- Collected data are subsequently used for statistical analysis as described in detail in the WHO SOP

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

■ animals are required for each test material, according to the WHO SOP adaptation to be used.

**B. The animals**

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

Species: male and female (50/50) ■ mice.

Origin: Registered breeder.

Estimated numbers[\*]: The calculation is mainly based on the stool sample analysis rather than on the number of OPV batch testing, because the number of stool samples to be analysed will by far exceed the



number of vaccine batches to be tested. In a first project about [REDACTED] stool samples are to be analysed, at [REDACTED] animals/sample [REDACTED] animals will be required at least. Criteria for invalidity and repeat tests have been defined and are provided in the WHO SOP (see also I). Taking this into account and assuming a 15% retest rate, an estimated total of [REDACTED] animals is required for this module. For vaccine lot/batch testing [REDACTED] mice are used per vaccine per dose (and a vaccine is tested at two doses). Vaccines could be tested as two test articles per run in comparison to one reference vaccine. We estimate that in the coming 5 years 10 OPVs will be evaluated for which [REDACTED] = [REDACTED] animals are required.

Total estimated number: [REDACTED]

Life stages: ≥ 6 weeks of age, according to the WHO SOP.

[\*, this information is based on recent communication with the Sponsor of the project, who is consulting poliovirus experts of WHO, [REDACTED] in the first project 100 volunteers will be included and 8 stool samples will be collected per volunteer. First the viral load is determined by PCR and virus titration. Poliovirus positive samples are then sequenced and it is estimated that in 300 samples mutations may be found and the WHO mouse NVT is then used to determine whether the genetic change is associated with a phenotypic change, i.e. neurovirulence].

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

#### Replacement

Currently, there is no *in vitro* test available for neurovirulence testing of poliovirus (vaccine) strains. The monkey NVT has largely been displaced by the [REDACTED] NVT. In order to train personnel on the intraspinal inoculation procedure, the use of live mice is unavoidable as (training of) the procedure depends on observations that can only be made in live animals.

#### Reduction

The number of animals to be used in each test is indicated by the WHO SOP, use of lower numbers would jeopardize the objective of the study. The number of animals are determined by careful statistical analysis based on data obtained from many developmental studies for the optimization of the protocol. Proper preparatory training at the [REDACTED] and in Modules 1 and 2 should allow us to minimize of the number of tests required to meet the objective.

#### Refinement

An important refinement factor lies in the fact the whole procedure is described in detail in a standard operating procedure (SOP) of the WHO, the quality is assured by the use of standard virus preparations, the mice can only be obtained from a supplier assigned by WHO and the training of personnel is solely in the hands of [REDACTED].

In the past decades several different strains of mice transgenic for the poliovirus receptor have been generated showing different expression levels of the poliovirus receptor in different compartments (central nervous system, digestive tract). The [REDACTED] mouse has been designated by WHO as the most suitable strain and will be used for this module This strain of mice will also be used in Module 3 of the project.

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

on the environment.

Animals will be anesthetized throughout the inoculation procedure. Humane endpoints for the follow-up period in which the animals may develop clinical signs of paresis and/or paralysis have been defined in order to minimise suffering (see J).

Procedures and equipment to be used will be selected according the WHO SOP in order to minimise animal suffering. No adverse effects on the environment are expected from these training procedures. The studies will be performed in DM-II facilities for which destruction procedures for handling of waste have been established.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

This is the first time this new OPV formulation will be tested for neurovirulence in stool samples obtained from inoculated volunteers in the context of a clinical trial. Furthermore, the evaluation of OPV batches will also involve unique testing unless under special circumstances peer reviewing is required.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The animals are anesthetized throughout the inoculation procedure. For the post-inoculation 14 day follow-up period, humane endpoints have been defined (see below). Post-operative analgesia will not be applied because there is a very minimal risk for pain from the operation wound and paresis and paralysis are not associated with pain. Analgesia would not be necessary and when it would be applied it could

obscure/interfere with the read out of the model.

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

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

The following adverse effects that impair the animals' welfare are described in the WHO SOP and can be expected to occur.

1. Death due to anesthesia, normally resulting in the animal not recovering from inoculation;
2. Death due to inoculation trauma;
3. Animals that show traumatic paresis/paralysis that appears within 24 hours after the inoculation where the paralysis does not progress. This is not applicable in cases where the animal recovers after the initial trauma. In this case the animal is scored according to the normal procedure.
4. Injury or death (worst case) as a direct result of fighting or injury;
5. Other non-identified causes of death where a relationship with poliovirus clinical progression is not evident;

Of note, this Module 2 describes the training required to optimize the skills of the inoculator so that this person is able to perform the actual NVT (Module 3). This training is also meant to reduce the change that a test would have to be repeated.

If more than 5% of animals are excluded for the reasons noted above the test should be repeated.

Explain why these effects may emerge.

See above.

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

For each of the above described adverse effects, the following measures are available:

1. Anesthesia is carefully dosed according to weight (see A)
2. Use of personnel trained and qualified for the inoculation procedure in Module 1. Severity is minimised by euthanasia of severely traumatized animals.
3. Use of personnel trained and qualified for the inoculation procedure in Module 1.
4. Daily observations and individual housing of animals when necessary. Euthanasia in case of severe injuries considered to be lethal, as judged by trained personnel.
5. N.A. Post-mortem analysis will be performed, this may result in identification of potential preventive measures.

### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

[same numbering as used in "I" and "J"]

1. not applicable (very acute, death under anesthesia);
2. The WHO SOP describes the inoculation procedure in detail with great attention for animal welfare aspects. Briefly, if the needle is inserted into the correct position, one or both hind legs should jerk. The number of attempted needle insertions will not exceed three. Once a jerk reaction is observed, the sample is injected slowly over a period of 2 to 5 seconds to minimize pressure caused by the entry of the injection volume while avoiding mechanical trauma caused by needle movement. The injection may be conducted by either one or two persons depending on whether one person can simultaneously position the needle and push the syringe plunger with ease. Where this proves difficult, or where the number of animals with mechanical inoculation trauma is high, a second person should be employed to push the plunger while the needle is held firmly in place by the first. During injection of the test material mice should exhibit jerks of the hind legs, and in some cases, twisting of the rear half of the body may be observed.

If the mouse is showing abnormal reflexes the mouse will be euthanized directly while still being under anesthesia

3. If the paralysis does progress the mouse will be euthanized.

4. The injury will be evaluated and if the injury is not severe the mouse may be placed in a separate cage

5. If an animal would show clinical signs that can not be related to the treatment (inoculation or poliovirus infection) like respiratory distress, the animal will be euthanized.

Additional information adapted from the WHO SOP related to the poliovirus infection:

Animals that show a paralysis clinical score in any limb or a paresis clinical score on 2 consecutive days are considered to have reached a point of no return (humane endpoint) and will be euthanized.

Physical signs for paralysis are:

- Unable to grip the edge of the cage.
- No use of limb on grid (e.g. a cage lid) or flat surface.
- Inability to move the limb forward.

Physical signs for paresis are:

- Unable to grip the edge of the cage.
- Limb falls through the grid (e.g. a cage lid) more than once while walking steadily forward and/or toes curl repeatedly while walking on a flat surface.
- At least a partial ability to move limb forward.

Indicate the likely incidence.

As there is no information available on the neurovirulence of virus present in the stool samples of volunteers vaccinated with the OPV formulation that is being analysed, incidence rates are considered likely to be equal to WHO reference materials at most. Depending on the neurovirulence of the WHO reference materials that will be used for inoculation and the available information on the use of those strains in a multi-laboratory study (Dragunsky et al., Bulletin of the WHO, 2003), the incidence is summarized in the following table:

Reference material	Incidence	
	Low dose	High dose
WHO/I (serotype 1)	up to 31%	up to 94%
WHO/III (serotype 3)	up to 57%	up to 97%

#### K. Classification of severity of procedures

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

Intraspinal inoculation: moderate

Clinical follow-up period: moderate due to the application of humane endpoints

### End of experiment

#### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

As these animals have been infected with poliovirus, they cannot be used for other purposes.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

██████████  
Nistelrooise Baan 3

5347 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD905002015320

**Bijlagen**

2

Datum 2 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002015320. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

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

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

### **Factuur**

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 90500  
Naam instelling of organisatie: BioXpert BV  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 54838134  
Straat en huisnummer: Nistelrooise Baan 3  
Postcode en plaats: 5347 RE SCHAIJK  
IBAN: NL72RABO0183605888  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: BioXpert BV

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 maart 2016  
Geplande einddatum: 1 maart 2021  
Titel project: Procedure training and analysis of neurovirulence of secreted polio viruses in OPV recipients  
Titel niet-technische samenvatting: Procedure training en analyse van neurovirulentie van uitgescheiden poliovirussen in OPV gevaccineerde vrijwilligers  
Naam DEC: WIL Research  
Postadres DEC: [REDACTED], The Netherlands  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.441,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur



**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:



Functie:

Vergunninghouder

Plaats:

Schaijk

Datum:

18 februari 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3  
5347 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD905002015320

**Bijlagen**

2

Datum 2 maart 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 2 maart 2016  
Vervaldatum: 1 april 2016  
Factuurnummer: 16700320

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015320	€ 1.441,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

██████████  
Nistelrooise Baan 3  
5374 RE Schaijk

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD905002015320

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
1

Datum 22 maart 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte ██████████,

Op 2 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Procedure training and analysis of neurovirulence of secreted polio viruses in OPV recipients" met aanvraagnummer AVD905002015320. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

**Niet technische samenvatting**

De Niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat teveel termen die te moeilijk zijn voor het brede publiek (bijvoorbeeld neurovirulentie). De term WHO zou de eerste keer voluit geschreven moeten worden. Daarnaast vragen wij u de titel te vereenvoudigen. Het ongerief voor de dieren beschreven in de NTS komt niet volledig overeen met wat is beschreven in de aanvraag (terminaal ongerief is wel beschreven in de aanvraag maar niet in de NTS). Ook verzoeken wij u de aantallen in de NTS en de aanvraag met elkaar in overeenstemming te brengen (In de NTS noemt u voor module 2 en 3 een totaal aantal dieren van ██████████, terwijl het aantal in de aanvraag op ██████████ uitkomt). Graag ontvangen wij een Niet technische samenvatting die voldoet aan de eisen. Deze eisen kunt u vinden op onze website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).

**Onduidelijkheden in projectvoorstel**

1) Kunt u voor module 1 en 3 vermelden of u mannelijke dieren, vrouwelijke dieren danwel dieren van beide geslachten zult gebruiken. Indien u enkel dieren van 1 geslacht gebruikt, kunt u dit dan onderbouwen?

2) In module 1 noemt u een aantal van 4 inoculators dat nodig is om de ██████████ samples van module 3 te kunnen testen, maar u beschrijft ook dat u 8 inoculators wilt gaan trainen (met bijbehorend aantal dieren). Kunt u dit verhelderen?

3) In module 3 beschrijft u dat u verwacht 20 OPVs te zullen testen in de komende 5 jaar, terwijl de berekening van het aantal dieren ( [REDACTED] ) rekening houdt met 10 OPVs. Kunt u het aantal dieren bevestigen?

4) In module 3 schrijft u onder vermindering over de training van de inoculators. Dit lijkt een copy-paste fout te zijn van module 2. Kunt u de vermindering specifiek maken voor module 3?

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

#### **Opsturen binnen veertien dagen**

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

#### **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.

#### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

#### **Datum**

22 maart 2016>

#### **Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD905002015320

**To:** CCD  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

**Date:** 30 maart 2016

**RE:** Aanvullende vragen voor projectvergunning dierproeven AVD905002015320, afgegeven d.d. 22 maart 2016.

**Cc:** [REDACTED]  
IvD BioXpert B.V.

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Op 22 maart 2016 ontvingen we uw aanvullende vragen op projectaanvraag AVD905002015320, getiteld 'Procedure training and analysis of neurovirulence of secreted polio viruses in OPV recipients'. In uw brief stelt u de volgende vragen:

Vraag NTS: *"De Niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat teveel termen die te moeilijk zijn voor het brede publiek (bijvoorbeeld neurovirulentie). De term WHO zou de eerste keer voluit geschreven moeten worden. Daarnaast vragen wij u de titel te vereenvoudigen. Het ongerief voor de dieren beschreven in de NTS komt niet volledig overeen met wat is beschreven in de aanvraag (terminaal ongerief is wel beschreven in de aanvraag maar niet in de NTS). Ook verzoeken wij u de aantallen in de NTS en de aanvraag met elkaar in overeenstemming te brengen (In de NTS noemt u voor module 2 en 3 een totaal aantal dieren van [REDACTED], terwijl het aantal in de aanvraag op [REDACTED] uitkomt). Graag ontvangen wij een Niet technische samenvatting die voldoet aan de eisen. Deze eisen kunt u vinden op onze website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)."*

Antwoord NTS: De NTS is aangepast op basis van de suggesties van de CCD. Het aantal van module 2 en 3 is inderdaad [REDACTED] en is als zodanig aangepast. De nieuwe versie van de NTS is toegevoegd.

Vraag 1 projectvoorstel: *"Kunt u voor module 1 en 3 vermelden of u mannelijke dieren, vrouwelijke dieren danwel dieren van beide geslachten zult gebruiken. Indien u enkel dieren van 1 geslacht gebruikt, kunt u dit dan onderbouwen?"*

Antwoord vraag 1 projectvoorstel: De richtlijnen van de WHO stellen dat in alle gevallen gelijke aantallen mannelijke en vrouwelijke dieren gebruikt dienen te worden. Dit is wel beschreven in module 2, maar is ook van toepassing voor module 1 en 3. Dit is aangepast in beide modules.

Module 1: "Species: male and female (50/50) ICR mice"



Module 2: "Species: male and female (50/50) [REDACTED] mice"



# Format DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 15-25 = *AVD 90500 2015 320*
2. Titel van het project: Procedure training and analysis of neurovirulence of secreted polioviruses in OPV recipients
3. Titel van de NTS: Procedure training en analyse van neurovirulentie van uitgescheiden poliovirussen in OPV gevaccineerde vrijwilligers
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam: DEC-WIL Research Europe
  - telefoonnummer contactpersoon: 
  - mailadres contactpersoon: 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 09.10.2015
  - aanvraag compleet: 09.10.2015 (initieel)
  - in vergadering besproken: 02.11.2015 en 08.02.2016
  - anderszins behandeld: vragen gesteld op 20.10.2015, 26.10.2015 en 5.11.2015
  - termijnonderbreking(en) van / tot: 5.11.2015 tot 15.01.2016
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t
  - aanpassing aanvraag: 20.10.2015 en 15.-1.2016
  - advies aan CCD: 08.02.2016
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum: 2.11.2015
  - Plaats: 's Hertogenbosch
  - Aantal aanwezige DEC-leden: 7
  - Aanwezige (namens) aanvrager: verantwoordelijke onderzoeker

- Strekking van de vraag / vragen: o.a. beschrijving ongerief, benoeming humane eindpunten, verwijzing wetgevende instantie.
- Strekking van het (de) antwoord(en): de vertegenwoordiging van de aanvrager heeft afdoende antwoord kunnen geven.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

#### 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 20.10.2015

- Strekking van de vraag / vragen
  1. Verzocht werd om nadere onderbouwing, met referenties, van de rol - in het regulatoire parcours - van de bepaling van de neurovirulente potentie van ontlastingsmonsters van, met een nieuw oraal poliovaccin behandelde, vrijwilligers; daarbij werd ook gevraagd naar details van de voorbehandeling van deze monsters, voordat deze intrasпинаal aan de muizen werden toegediend.
  2. Gevraagd werd naar *in vitro* tests die de vigerende test zouden kunnen vervangen.
  3. Gevraagd werd naar nadere beschrijving van het ongeriefclassificatie
  4. Gevraagd werd de te gebruiken anesthesie nader te specificeren.
  5. Gevraagd werd om de schatting van de dieraantallen nader te specificeren.

- Datum antwoord: 21.10.2015

- Strekking van het (de) antwoord(en):

1. De onderzoeker heeft de vragen beantwoord en de aanvraag/appendices conform de antwoorden aangepast.

- Datum: 26.10.2015

- Strekking van de vraag / vragen

1. Gevraagd werd om verduidelijking van de beschrijving van het ongerief
2. Gevraagd werd om een volledig ingevuld aanvraagformulier
3. Gevraagd werd om beschikbaarheid tijdens de geplande DEC vergadering.

- Datum antwoord: 29.10.2015

- Strekking van het (de) antwoord(en):

1. De onderzoeker heeft de vragen beantwoord en de aanvraag/appendices conform de antwoorden aangepast.

- Datum: 5.11.2015

- Strekking van de vraag / vragen

Gevraagd werd naar

- een ondertekend aanvraagformulier, waaruit blijkt dat de aanvraag is afgestemd met de IvD



- aan te geven hoe wordt gezekerd, dat de procedures die uitgevoerd worden voor training van personeel, ook inderdaad gebruikt worden voor de uitvoering van neurovirulentietesten in de projectperiode
  - nadere omschrijving van de aard van het verwachte ongerief
  - nadere omschrijving van de humane eindpunten.
  - Datum antwoord: 15.01.2016
  - Strekking van het (de) antwoord(en):
    1. Alle vragen worden naar tevredenheid beantwoord.
    2. Het trainingsprogramma zal pas starten nadat opdracht is verkregen
    3. De projectaanvraag, modules en NTS zijn op de gevraagde punten aangepast.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Expert advies

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe projectvergunningaanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren op grond van haar expertise op het gebied van wettelijk verplicht onderzoek
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

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

1. Het project is:

Wettelijk vereist onderzoek

Uit onderwijskundig oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doel categorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en)
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Zowel de training van het personeel als het onderzoek naar de aanwezigheid van neurovirulente virussen wordt ingeschat als een essentieel belang
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderdelen hebben een logische samenhang en volgorde.
5. De keuze van zowel de wildvorm als transgene muis is regulator (WHO) voorgeschreven en wetenschappelijk onderbouwd
6. De verwachte ernst van het ongerief als gevolg van de dierproeven wordt ingeschat als minimaal voor module 1, en als matig voor dieren in module 2 en 3.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Beschikbare proefdiervrije alternatieven hebben onvoldoende gevoeligheid en voldoen niet aan door WHO gestelde eisen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Zowel de training (competentie) van personeel als het onderzoek aan neurovirulentie van faecesmonsters volgt internationale richtlijnen (WHO) waarin procedures en dieraantallen zijn vastgelegd. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De opdrachtgever beschikt over uitstekende expertise en voldoende informatie om, bij dit wettelijk vereiste onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

## D. Ethische afweging:

De centrale morele vraag is: Rechtvaardigt het directe doel (training van personeel en uitvoering van de polio-neurovirulentie test) in het licht van het uiteindelijke doel en de haalbaarheid van het project, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan? Het doel van het project betreft het leveren van een bijdrage aan wereldwijd uitroeien van polio. Dit betreft een maatschappelijk belang. De WHO speelt in de wereldwijde aanpak een coördinerende rol en bewaakt de kwaliteit van stappen (waaronder dierproeven) van partijen hierin. De opdrachtgever is een van de partijen (CRO) die dierproeven uitvoert en heeft hierin ook een economisch belang. De DEC ziet dit project als maatschappelijk relevant in het licht van de verantwoordelijkheid om ziekten waar mogelijk te bestrijden. De DEC is van mening dat de noodzakelijke dierproeven door de opdrachtgever en in de instelling van de aanvrager op professionele wijze kan worden uitgevoerd op een wijze waarbij de belasting van proefdieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Een mondiale aanpak van polio vraagt om standaardisering van producten en procedures. De aanvrager heeft grote wetenschappelijke en technische expertise op virologisch gebied en wil de neurovirulentie test aan haar test repertoire toevoegen. Daartoe dient personeel adequaat getraind te worden. Daarom ook is training een onvervreemdbaar onderdeel van de aanvraag. Zowel de training, de eisen waaraan gekwalificeerd personeel moet voldoen, als de uitvoering van de virulentie test zelf, zijn in detail beschreven in SOPs die door de WHO in nauw overleg met internationale experts zijn opgesteld. De DEC beoordeelt de beschrijvingen in de SOPs als zorgvuldig ook naar de proefdieren. Tot slot is in de overwegingen betrokken dat de aanvrager, mede om economische redenen, pas de training van additionele werknemers zal beginnen bij een concrete testopdracht.

## E. Advies

1. Advies aan de CCD

**De DEC adviseert de vergunning te verlenen**

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus
3. Het advies heeft betrekking op versie 15.01.2016 van de aanvraag

10 december 2014

Namens de DFC



voorzitter



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5347 RE SCHAIJK



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD905002015320  
**Bijlagen**  
1

Datum 8 april 2016

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 2 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Procedure training and analysis of neurovirulence of secreted polio viruses in OPV recipients" met aanvraagnummer AVD905002015320. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 4 en 8 april 2016 heeft u op ons verzoek uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een aanpassing van de NTS, uitleg over gebruik van beide geslachten, verheldering dieraantallen, verheldering aantal te testen OPVs en verduidelijking van toegepaste vermindering in bijlage 3. Deze antwoorden waren voldoende.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

De algemene voorwaarde betreffende het afstemmen van de go/no go momenten met de IvD wordt gesteld om onnodige inzet van dieren in dierproeven te voorkomen.

De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel.

U kunt met uw project "Procedure training and analysis of neurovirulence of secreted polio viruses in OPV recipients" starten. De vergunning wordt afgegeven van 8 april 2016 tot en met 1 maart 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie WIL Research gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 februari 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Met het oog op Art. 10a1 worden algemene voorwaarden toegevoegd.

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

**Bezwaar**

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

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

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

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

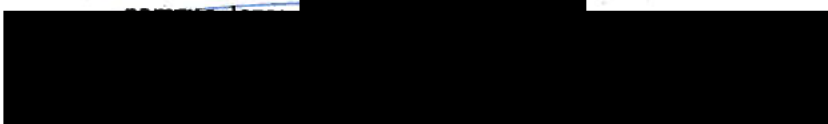
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

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

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven

  
ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

-Vergunning

Hiervan deel uitmakend:

-DEC-advies

-Weergave wet- en regelgeving

## **Projectvergunning**

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: BioXpert BV  
Adres: Nistelrooise Baan 3  
Postcode en plaats: 5347 RE SCHAIJK  
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 08 april 2016 tot en met 1 maart 2021, voor het project "Procedure training and analysis of neurovirulence of secreted polio viruses in OPV recipients" met aanvraagnummer AVD905002015320, volgens advies van Dierexperimentencommissie WIL Research. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Voorzitter IvD verantwoordelijk.  
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 4 april 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 april 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 februari 2016, ontvangen op 2 maart 2016.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 4 en 8 april 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Module 1. Training of inoculators using conventional mice	Muizen (Mus musculus) / ICR	██████	100 % Terminal	
Module 2. Training of inoculators using ████████ mice	Muizen (Mus musculus) / ████████	██████	100 % Matig	
Module 3. Testing of stool samples from clinical trials for OPV safety assessment	Muizen (Mus musculus) / ████████	██████	100 % Matig	

#### Voorwaarden

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

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

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

#### Voorschriften

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

## **Verzorging**

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

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

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

## **Pijnbestrijding en verdoving**

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

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

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

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

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

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

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

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