

8) In bijlage 3.4.4.5 beschrijft u niet waar de hamsters vandaan komen. Graag dit voor de volledigheid nog invullen.

9) In bijlage 3.4.4.6 beschrijft u het opwekken van antilichamen in dieren. Het recent uitgebrachte rapport "EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies" beschrijft dat er alternatieven beschikbaar zijn voor het opwekken van antilichamen waarvoor geen dieren gebruikt hoeven worden. Kunt u nader onderbouwen waarom in uw geval proefdiervrije methoden niet mogelijk zijn?

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

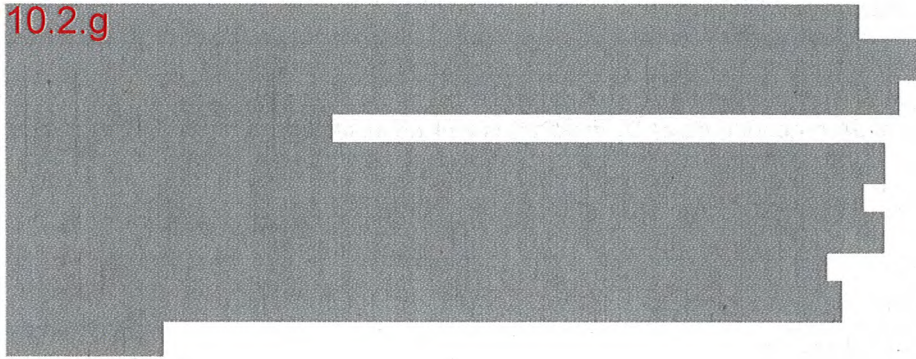
Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

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

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

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

10.2.g



Van: Info-zbo
Aan: 10.2.g
Onderwerp: FW: Aanhouden AVD 10.2.g 209944
Datum: woensdag 10 juni 2020 12:27:29

Geachte DEC,
 Onderstaande vragen zijn nog gesteld aan de aanvrager. Dit is voor uw informatie. U bent vrij om hier nog op te reageren richting de CCD, maar dit is niet noodzakelijk.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Van: info@zbo-ccd.nl

Verzonden: woensdag 10 juni 2020 12:25

Aan: 10.2.e

CC: 10.2.e

Onderwerp: Aanhouden AV 10.2.g 09944

Geachte 10.2.e,

Op 14-05-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of a SARS-CoV-2 vaccine for cats and ferrets" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 0209944. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

1a) U geeft aan vaccins te willen ontwikkelen om te voorkomen dat wanneer de huidige uitbraak van SARS-CoV-2 onder mensen onder controle is, herinfectie via dieren plaatsvindt. Voor de kat is dit ons duidelijk. Voor de fret is dit echter minder aannemelijk, omdat fretten over het algemeen niet, zoals katten, vrij buiten lopen, en veel minder fretten als huisdier worden gehouden. Kunt u nader onderbouwen waarom u juist een vaccin voor de fretten wilt ontwikkelen?

1b) U geeft aan geen vaccin te ontwikkelen voor nertsen. Zou het vaccin wat u ontwikkelt voor fretten, ook kunnen werken in nertsen?

2) In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u de bloedafname bij cavia's. Uit het DEC advies blijkt dat u deze bloedafnames doet middels hartpuncties. Kunt u de route van bloedafname toevoegen aan de bijlage dierproeven, met hierbij de uitleg over de kans dat dieren door deze handeling uitvallen. Indien dieren uitvallen door deze handelingen, kunt u hierbij een humaan eindpunt beschrijven?

3) In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u onder vraag B het gebruik van 81 katten en 81 fretten, terwijl u onder vraag K spreekt van 117 katten en 117 fretten. Graag dit consistent maken.

4) In bijlage 3.4.4.2 heeft u vraag I niet ingevuld. Uit het DEC advies halen wij dat er geen andere nadelige effecten zullen zijn voor de dieren. Graag dit invullen bij vraag I, zodat duidelijk is dat u deze vraag niet over het hoofd heeft gezien.

5) In bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 beschrijft u dat dieren van eerdere studies kunnen worden hergebruikt. Hergebruik van dieren is in principe alleen toegestaan indien voldaan is aan onder andere de voorwaarde dat de voorgaande dierproeven met licht of matig ongerief gepaard gingen, en de volgende dierproef is ingedeeld in de categorie licht, matig of terminaal. In uw bijlagen dierproeven kunnen de dieren mogelijk ernstig ongerief ondervinden. Dit dient bij vraag C van deze bijlagen te worden ingevuld, waarbij een rechtvaardiging van hergebruik van deze dieren dient te worden gegeven, of hoe voorkomen wordt dat dieren die worden hergebruikt ernstig ongerief ondergaan.

6) In bijlage 3.4.4.3 beschrijft u 4 studies met 14 hamsters per studie (6 gevaccineerde dieren, 6 controle dieren en 2 sentinel dieren). Zou het totaal aantal dieren hierbij dan niet op 56 moeten uitkomen, in plaats van de aangevraagde 54?

7a) In bijlage 3.4.4.3 beschrijft u transport van dieren binnen het experiment omdat de challenge van de dieren op een andere locatie plaatsvindt dan de vaccinatie. Een dierproef dient op een zo verfijnd mogelijke methode te worden uitgevoerd. Extra transport levert de dieren extra ongerief op. Kunt u aangeven waarom het niet mogelijk is de dieren op dezelfde locatie te vaccineren als waar de challenge plaatsvindt?

7b) Indien transport van de dieren niet voorkomen kan worden, kunt u dan meer informatie opnemen in de aanvraag over de wijze en duur van het transport, en wat gedaan wordt om het ongerief van de dieren tijdens en als gevolg van het transport te beperken?

8) In bijlage 3.4.4.5 beschrijft u niet waar de hamsters vandaan komen. Graag dit voor de volledigheid nog invullen.

9) In bijlage 3.4.4.6 beschrijft u het opwekken van antilichamen in dieren. Het recent uitgebrachte rapport "EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies" beschrijft dat er alternatieven beschikbaar zijn voor het opwekken van antilichamen waarvoor geen dieren gebruikt hoeven worden. Kunt u nader onderbouwen waarom in uw geval proefdiervrije methoden niet mogelijk zijn?

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: 10.2.g
Aan: Info-zbo
Cc: 10.2.e
Onderwerp: RE: Aanhouden AVD 10.2.g 09944 [Vertrouwelijk-Confidential]
Datum: maandag 22 juni 2020 09:32:31
Bijlagen: image001.png

Vertrouwelijk-Confidential

Beste 10.2.e

De antwoorden op onderstaande vragen + aangepaste documenten m.b.t. AVD 10.2.g 209944 zijn zojuist via NetFTP opgestuurd.

Vriendelijke groeten,

10.2.e en 10.2.g

[Redacted signature block]

From: Info-zbo

Sent: woensdag 10 juni 2020 12:26

To: 10.2.g

Cc: 10.2.e

Subject: Aanhouden AVD 10.2.g 09944

EXTERNAL EMAIL – Use caution with any links or file attachments.

Geachte 10.2.e

Op 14-05-2020 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of a SARS-CoV-2 vaccine for cats and ferrets" met aanvraagnummer AV 10.2.g 209944. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

1a) U geeft aan vaccins te willen ontwikkelen om te voorkomen dat wanneer de huidige uitbraak van SARS-CoV-2 onder mensen onder controle is, herinfectie via dieren plaatsvindt. Voor de kat is dit ons duidelijk. Voor de fret is dit echter minder aannemelijk, omdat fretten over het algemeen niet, zoals katten, vrij buiten lopen, en veel minder fretten als huisdier worden gehouden. Kunt u nader onderbouwen waarom u juist een vaccin voor de fretten wilt ontwikkelen?

1b) U geeft aan geen vaccin te ontwikkelen voor nertsen. Zou het vaccin wat u ontwikkelt voor fretten, ook kunnen werken in nertsen?

2) In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u de bloedafname bij cavia's. Uit het DEC advies blijkt dat u deze bloedafnames doet middels hartpuncties. Kunt u de route van bloedafname toevoegen aan de

bijlage dierproeven, met hierbij de uitleg over de kans dat dieren door deze handeling uitvallen. Indien dieren uitvallen door deze handelingen, kunt u hierbij een humaan eindpunt beschrijven?

3) In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u onder vraag B het gebruik van 81 katten en 81 fretten, terwijl u onder vraag K spreekt van 117 katten en 117 fretten. Graag dit consistent maken.

4) In bijlage 3.4.4.2 heeft u vraag I niet ingevuld. Uit het DEC advies halen wij dat er geen andere nadelige effecten zullen zijn voor de dieren. Graag dit invullen bij vraag I, zodat duidelijk is dat u deze vraag niet over het hoofd heeft gezien.

5) In bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 beschrijft u dat dieren van eerdere studies kunnen worden hergebruikt. Hergebruik van dieren is in principe alleen toegestaan indien voldaan is aan onder andere de voorwaarde dat de voorgaande dierproeven met licht of matig ongerief gepaard gingen, en de volgende dierproef is ingedeeld in de categorie licht, matig of terminaal. In uw bijlagen dierproeven kunnen de dieren mogelijk ernstig ongerief ondervinden. Dit dient bij vraag C van deze bijlagen te worden ingevuld, waarbij een rechtvaardiging van hergebruik van deze dieren dient te worden gegeven, of hoe voorkomen wordt dat dieren die worden hergebruikt ernstig ongerief ondergaan.

6) In bijlage 3.4.4.3 beschrijft u 4 studies met 14 hamsters per studie (6 gevaccineerde dieren, 6 controle dieren en 2 sentinel dieren). Zou het totaal aantal dieren hierbij dan niet op 56 moeten uitkomen, in plaats van de aangevraagde 54?

7a) In bijlage 3.4.4.3 beschrijft u transport van dieren binnen het experiment omdat de challenge van de dieren op een andere locatie plaatsvindt dan de vaccinatie. Een dierproef dient op een zo verfijnd mogelijke methode te worden uitgevoerd. Extra transport levert de dieren extra ongerief op. Kunt u aangeven waarom het niet mogelijk is de dieren op dezelfde locatie te vaccineren als waar de challenge plaatsvindt?

7b) Indien transport van de dieren niet voorkomen kan worden, kunt u dan meer informatie opnemen in de aanvraag over de wijze en duur van het transport, en wat gedaan wordt om het ongerief van de dieren tijdens en als gevolg van het transport te beperken?

8) In bijlage 3.4.4.5 beschrijft u niet waar de hamsters vandaan komen. Graag dit voor de volledigheid nog invullen.

9) In bijlage 3.4.4.6 beschrijft u het opwekken van antilichamen in dieren. Het recent uitgebrachte rapport "EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies" beschrijft dat er alternatieven beschikbaar zijn voor het opwekken van antilichamen waarvoor geen dieren gebruikt hoeven worden. Kunt u nader onderbouwen waarom in uw geval proefdiervrije methoden niet mogelijk zijn?

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van dit bericht op. U kunt

dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

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

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

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

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.
The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

10.2.g

10.2.g | 21 juni 2020

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,
Beste 10.2.e

Op 10 juni jongsteleden ontvingen wij uw vragen naar aanleiding van de behandeling van onze aanvraag voor een projectvergunning dierproeven "Development of a SARS-CoV-2 vaccine for cats and ferrets" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 09944.

Wij danken u voor de snelle behandeling van deze aanvraag, het terugkoppelen van onduidelijkheden aan uw kant en het wijzen op een aantal onvolkomenheden in de aanvraag. U ontvangt hierbij het antwoord op de gestelde vragen, en de aangepaste documenten. In afwachting van uw antwoord,

Met vriendelijke groet, 10.2.e

1a) U geeft aan vaccins te willen ontwikkelen om te voorkomen dat wanneer de huidige uitbraak van SARS-CoV-2 onder mensen onder controle is, herinfectie via dieren plaatsvindt. Voor de kat is dit ons duidelijk. Voor de fret is dit echter minder aannemelijk, omdat fretten over het algemeen niet, zoals katten, vrij buiten lopen, en veel minder fretten als huisdier worden gehouden. Kunt u nader onderbouwen waarom u juist een vaccin voor de fretten wilt ontwikkelen?

Voor zowel kat als fret willen we een geregistreerd vaccin op de markt brengen. 10.1.c

Slechts een klein aantal (huis)dieren is nu in beeld als gevoelig voor infecties met SARS-CoV-2. De kat is veruit de belangrijkste hiervan, voor de kat willen we een geregistreerd vaccin op de markt brengen. Andere gevoelige huisdiersoorten zijn hamster, fret, en mogelijk konijn. Omdat fretten door eigenaren zeer intensief gehanteerd worden, en de dieren geïnfecteerd kunnen worden met SARS-CoV-2, is er dus ook een groot blootstellingsrisico. Dit risico willen we met een vaccin verkleinen.

1b) U geeft aan geen vaccin te ontwikkelen voor nertsen. Zou het vaccin wat u ontwikkelt voor fretten, ook kunnen werken in nertsen?

Zie antwoord hierboven: Net als de fret hoort een nerts tot de marterachtigen, en de kans dat ons vaccin 10.1.c in deze diersoort gaat werken is zeer groot.

2) In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u de bloedafname bij cavia's. Uit het DEC advies blijkt dat u deze bloedafnames doet middels hartpuncties. Kunt u de route van bloedafname toevoegen aan de bijlage dierproeven (aanpassing aan Bijlage 3.4.4.1 gemaakt, aangegeven in geel gearceerd), met hierbij de uitleg over de kans dat dieren door deze handeling uitvallen. Indien dieren uitvallen door deze handelingen, kunt u hierbij een humaan eindpunt beschrijven?

Hartpunctie wordt gedaan onder algehele anesthesie. Na hartpunctie wordt de anesthesie geantagoneerd. Hierbij wordt in de gaten gehouden of de cavia's goed wakker worden en weer actief en alert zijn. Rest van de dag en dagen na hartpunctie worden de cavia's extra goed in de gaten gehouden. Humaan eindpunt is, algehele malaise (niet actief, bol zitten, piloerectie).

In de bijlage 3.4.4.1. is het antwoord op vraag J aangepast. Ook de ongeriefscore is aangepast in deze bijlage, vraag K, en in de NTS.

3) In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u onder vraag B het gebruik van 81 katten en 81 fretten, terwijl u onder vraag K spreekt van 117 katten en 117 fretten. Graag dit consistent maken.

Dank voor het alert maken op deze fout. De getallen zijn aangepast (geel gearceerd).

10.2.g

4) In bijlage 3.4.4.2 heeft u vraag I niet ingevuld. Uit het DEC advies halen wij dat er geen andere nadelige effecten zullen zijn voor de dieren. Graag dit invullen bij vraag I, zodat duidelijk is dat u deze vraag niet over het hoofd heeft gezien.

Deze vraag is ingevuld (geel gearceerd).

5) In bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 beschrijft u dat dieren van eerdere studies kunnen worden hergebruikt. Hergebruik van dieren is in principe alleen toegestaan indien voldaan is aan onder andere de voorwaarde dat de voorgaande dierproeven met licht of matig ongerief gepaard gingen, en de volgende dierproef is ingedeeld in de categorie licht, matig of terminaal. In uw bijlagen dierproeven kunnen de dieren mogelijk ernstig ongerief ondervinden. Dit dient bij vraag C van deze bijlagen te worden ingevuld, waarbij een rechtvaardiging van hergebruik van deze dieren dient te worden gegeven, of hoe voorkomen wordt dat dieren die worden hergebruikt ernstig ongerief ondergaan.

In Bijlage 2, optimizing challenge model, is de 10% ernstig ongerief aangehouden als een worst case scenario. Bij het opzetten van een model voor een nieuwe ziekte is per definitie geen ervaring met het model en is er altijd een kleine kans dat er ongewild ernstig ongerief optreedt omdat symptomen te laat herkend worden, we moeten hierin realistisch zijn. Met andere woorden: 100% zeker kun je niet zeggen dat het maximaal matig ongerief is, want er zouden gevallen van ernstig ongerief door benauwdheid kunnen optreden. De kans achter we klein. Vandaar dat we nu voor bijlage 2 hergebruik naar nee hebben gezet. Als blijkt uit dat er in studies inderdaad geen ernstig ongerief gescoord wordt, dan vragen we een wijziging aan om hergebruik mogelijk te maken op basis van 100% matig ongerief.

Ernstig ongerief bij hergebruikte dieren in bijlage 3 (studies die volgen na afloop van studies uit bijlage 2) zal voorkomen worden door goed omschreven HEPs en meer frequente observatie van de dieren. Daarnaast zullen we gebruik kunnen maken van onze eigen kennis opgedaan in de challenge model studies bijlage 2, 10.1.c

Voor de studies in bijlage 3 geldt dat, met de kennis opgedaan uit de studies in bijlage 2 10.1.c ernstig ongerief op termijn helemaal uitgesloten kan worden omdat we de eindpunten herkennen. Vandaar dat we onze verwachtingen iets hebben bijgesteld en dat we in de studies beschreven in 3 uiteindelijk geen ernstig ongerief zullen scoren, mede omdat uit reeds gepubliceerde studies steeds meer duidelijk wordt dat dieren mildere symptomen van Covid-19 ondervinden dan mensen (ontwikkelingen gaan snel).

In Bijlage 2 is vraag C aangepast naar NO.

In Bijlage 3 is de ongeriefscore veranderd naar 100% moderate en zijn de passages over ernstig ongerief aangepast.

In de NTS is de ongeriefscore aangepast.

6) In bijlage 3.4.4.3 beschrijft u 4 studies met 14 hamsters per studie (6 gevaccineerde dieren, 6 controle dieren en 2 sentinel dieren). Zou het totaal aantal dieren hierbij dan niet op 56 moeten uitkomen, in plaats van de aangevraagde 54?

Dank voor het alert maken op deze onduidelijkheid. De studie setup is niet goed gespecificeerd. De calculatie is als volgt:

Maximum 4 vaccin kandidaten testen, met in total 24 dieren (4 x 6 dieren).

Aan elke groep worden 2 sentinels toegevoegd, 4 x 2 sentinels (8 dieren).

Het is voor de hand liggend dat vaccin kandidaten niet gelijktijdig getest zullen worden (testen van vaccin kandidaten 2 aan 2, tweede experiment pas als eerste twee kandidaten niks opleveren), vandaar dat er rekening gehouden wordt met twee challenge-control groepen

Dat betekent 16 challenge-control (6 challenged plus 2 sentinel per groep).

Per groep 1 negatieve controle voor sectie aan het begin van de proef (6 dieren).

Totaal $24 + 8 + 16 + 6 =$ maximum 54 dieren. Dit aantal is dus in de aanvraag blijven staan maar tekst is uitgebreid.

10.2.g

7a) In bijlage 3.4.4.3 beschrijft u transport van dieren binnen het experiment omdat de challenge van de dieren op een andere locatie plaatsvindt dan de vaccinatie. Een dierproef dient op een zo verfijnd mogelijke methode te worden uitgevoerd. Extra transport levert de dieren extra ongerief op. Kunt u aangeven waarom het niet mogelijk is de dieren op dezelfde locatie te vaccineren als waar de challenge plaatsvindt?

Dit heeft te maken met de beschikbare BSL3 faciliteiten waar met SARS-CoV-2 gewerkt mag worden. Deze zijn beperkt en de druk op deze faciliteiten is hoog. Er ontstaat dus altijd een situatie waarin dieren van een BSL2 faciliteit naar een BSL3 faciliteit verplaatst worden. 10.1.c

7b) Indien transport van de dieren niet voorkomen kan worden, kunt u dan meer informatie opnemen in de aanvraag over de wijze en duur van het transport, en wat gedaan wordt om het ongerief van de dieren tijdens en als gevolg van het transport te beperken?

De dieren zullen getransporteerd worden in kooien die goedgekeurd zijn voor transport onder SPF condities zodat mogelijke besmettingen onderweg voorkomen wordt. De duur is maximaal 1,5 uur. Het betreft groepstransport (dieren niet solitair gedurende transport maar wel in behandelingsgroepen), voorzien van voedsel en water. Het transport is temperatuur gecontroleerd en afdoende geventileerd (geconditioneerd transport). Het ongerief wordt hiermee tot een minimum beperkt

De betreffende passage is aangepast in bijlage 3

8) In bijlage 3.4.4.5 beschrijft u niet waar de hamsters vandaan komen. Graag dit voor de volledigheid nog invullen. Hamsters komen van Charles River (Verenigde Staten) of een andere SPF leverancier, leeftijd 4-6 week of ouder. Aangepast in bijlage 5

9) In bijlage 3.4.4.6 beschrijft u het opwekken van antilichamen in dieren. Het recent uitgebrachte rapport "EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies" beschrijft dat er alternatieven beschikbaar zijn voor het opwekken van antilichamen waarvoor geen dieren gebruikt hoeven worden. Kunt u nader onderbouwen waarom in uw geval proefdiervrije methoden niet mogelijk zijn?

Voor productontwikkeling is het belangrijk om specifieke monoklonale antilichamen te genereren met een hoge affiniteit voor het SARS-CoV-2 antigeen dat gebruikt wordt als vaccin. Monoclonale antilichamen worden gebruikt in de R&D fase, maar met name ook in de kwaliteitscontrole van de vaccins zodat we kunnen garanderen dat de vaccins dieren ook daadwerkelijk gaan beschermen tegen ziekte.

Een goede monoclonale antistof voor testontwikkeling moet een hoge affiniteit en specificiteit hebben om toepassing in kwaliteitscontrole mogelijk te maken. Dit is essentieel voor het opzetten van diagnostische testen. Voor de productie van specifieke en hoog-affiene antistoffen is de productie in hybridomacellen (cellen uit de milt van een gevaccineerde muis worden met een myeloma cellijn gefuseerd om hybridoma cellijnen te maken, welke oneindig gebruikt kunnen worden voor de productie van deze specifieke monoklonale antilichamen in *in vitro* celkweek) noodzakelijk.

10.1.c

Er zijn veel nieuwe ontwikkelingen, zoals recombinante antilichaambanken (faagdisplay), DNA- en RNA-aptameren en proteïn scaffolds. Ondanks de grote belofte van deze technologieën, worden zeker nog niet altijd moleculen gegenereerd en geselecteerd die de affiniteit en specificiteit hebben welke vereist zijn voor de ontwikkeling van de benodigde diagnostische testen. Zoals in Sorouri *et al.* (2014) wordt samengevat: "Finally, the phage-derived tetanus-specific clones had a lower binding affinity than the hybridomas, a phenomenon thought to be the result of random pairing of the V-genes" [1].

10.2.g

Wij denken dat het noodzakelijk is een klein aantal muizen voor dit onderzoek te gebruiken omdat er geen goede gelijkwaardige alternatieven beschikbaar zijn voor de consistente productie van specifieke en hoog-affiene monoklonale antilichamen voor testontwikkeling.

Nieuwe ontwikkelingen in het veld worden op de voet gevolgd en er wordt geïnvesteerd in de ontwikkeling van deze nieuwe technologieën, zowel in eigen huis als in nauwe samenwerking met externe partijen. De resultaten van deze investeringen zullen worden geïmplementeerd zodra de technologieën even goede reagentia opleveren voor de ontwikkeling van de kwaliteitscontrole-testen. In de aanvraag is al aangegeven dat miltcellen van gevaccineerde cavia's uit bijlage 1 gebruikt gaan worden voor hybridoma fusies, indien dit antistof producerende cellijnen op zou leveren is gebruik van muizen uit bijlage 6 niet meer nodig. Hier kan echter op dit moment geen zekerheid over gegeven worden.

1. Sorouri M, Fitzsimmons SP, Aydanian AG, Bennett S, Shapiro MA (2014) Diversity of the Antibody Response to Tetanus Toxoid: Comparison of Hybridoma Library to Phage Display Library. PLoS ONE 9(9): e106699. doi:10.1371/journal.pone.0106699



Advies aan CCD

B

Datum 23 juni 2020

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20209944

Instelling: 10.2.g
Onderzoeker: 10.2.e
Project: Development of a SARS-CoV-2 vaccine for cats and ferrets
Aanvraagnummer: AVD20209944
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Translationeel of toegepast onderzoek
Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie

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

Proces	<p>Het DEC advies en de aangepaste documenten waren op 8 juni 2020 in bezit van het Secretariaat. Op 10 juni 2020 zijn onderstaande vragen gesteld aan de aanvrager. Deze heeft op 22 juni 2020 de vragen beantwoord (zie vergaderstuk AVD20209944g). In deze adviesnota zijn de gegeven antwoorden door de aanvrager verwerkt.</p> <p>Gestelde vragen:</p> <p>1a) U geeft aan vaccins te willen ontwikkelen om te voorkomen dat wanneer de huidige uitbraak van SARS-CoV-2 onder mensen onder controle is, herinfectie via dieren plaatsvindt. Voor de kat is dit ons duidelijk. Voor de fret is dit echter minder aannemelijk, omdat fretten over het algemeen niet, zoals katten, vrij buiten lopen, en veel minder fretten als huisdier worden gehouden. Kunt u nader onderbouwen waarom u juist een vaccin voor de fretten wilt ontwikkelen?</p> <p>1b) U geeft aan geen vaccin te ontwikkelen voor nertsen. Zou het vaccin wat u ontwikkelt voor fretten, ook kunnen werken in nertsen?</p> <p>2) In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u de bloedafname bij cavia's. Uit het DEC advies blijkt dat u deze bloedafnames doet middels hartpuncties. Kunt u de route van bloedafname toevoegen aan de bijlage dierproeven, met hierbij de uitleg over de kans dat dieren door deze handeling uitvallen. Indien dieren uitvallen door deze handelingen, kunt u hierbij een humaan eindpunt beschrijven?</p> <p>3) In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u onder vraag B het gebruik van 81 katten en 81 fretten, terwijl u onder vraag K spreekt van 117 katten en 117</p>
---------------	---

fretten. Graag dit consistent maken.

4) In bijlage 3.4.4.2 heeft u vraag I niet ingevuld. Uit het DEC advies halen wij dat er geen andere nadelige effecten zullen zijn voor de dieren. Graag dit invullen bij vraag I, zodat duidelijk is dat u deze vraag niet over het hoofd heeft gezien.

5) In bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 beschrijft u dat dieren van eerdere studies kunnen worden hergebruikt. Hergebruik van dieren is in principe alleen toegestaan indien voldaan is aan onder andere de voorwaarde dat de voorgaande dierproeven met licht of matig ongerief gepaard gingen, en de volgende dierproef is ingedeeld in de categorie licht, matig of terminaal. In uw bijlagen dierproeven kunnen de dieren mogelijk ernstig ongerief ondervinden. Dit dient bij vraag C van deze bijlagen te worden ingevuld, waarbij een rechtvaardiging van hergebruik van deze dieren dient te worden gegeven, of hoe voorkomen wordt dat dieren die worden hergebruikt ernstig ongerief ondergaan.

6) In bijlage 3.4.4.3 beschrijft u 4 studies met 14 hamsters per studie (6 gevaccineerde dieren, 6 controle dieren en 2 sentinel dieren). Zou het totaal aantal dieren hierbij dan niet op 56 moeten uitkomen, in plaats van de aangevraagde 54?

7a) In bijlage 3.4.4.3 beschrijft u transport van dieren binnen het experiment omdat de challenge van de dieren op een andere locatie plaatsvindt dan de vaccinatie. Een dierproef dient op een zo verfijnd mogelijke methode te worden uitgevoerd. Extra transport levert de dieren extra ongerief op. Kunt u aangeven waarom het niet mogelijk is de dieren op dezelfde locatie te vaccineren als waar de challenge plaatsvindt?

7b) Indien transport van de dieren niet voorkomen kan worden, kunt u dan meer informatie opnemen in de aanvraag over de wijze en duur van het transport, en wat gedaan wordt om het ongerief van de dieren tijdens en als gevolg van het transport te beperken?

8) In bijlage 3.4.4.5 beschrijft u niet waar de hamsters vandaan komen. Graag dit voor de volledigheid nog invullen.

9) In bijlage 3.4.4.6 beschrijft u het opwekken van antilichamen in dieren. Het recent uitgebrachte rapport "EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies" beschrijft dat er alternatieven beschikbaar zijn voor het opwekken van antilichamen waarvoor geen dieren gebruikt hoeven worden. Kunt u nader onderbouwen waarom in uw geval proefdiervrije methoden niet mogelijk zijn?

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Selection of candidate vaccines				
	Cavia's (Cavia porcellus)		180	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.2 Optimization of the challenge model				
	Syrische goudhamsters (Mesocricetus auratus)		117	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Katten (Felis catus)		81	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Fretten (Mustela putorius furo)		81	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters				
	Katten (Felis catus)		150	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Fretten (Mustela putorius furo)		150	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Syrische goudhamsters (Mesocricetus auratus)		54	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.4 Safety studies in cats and ferrets				
	Katten (Felis catus)		90	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Fretten (Mustela putorius furo)		90	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.5 Safety studies in non-target animals				
	Muizen (Mus musculus)		45	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Konijnen (Oryctolagus cuniculus)		45	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Kippen		45	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Honden (Canis familiaris)		45	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Syrische goudhamsters (Mesocricetus auratus)		45	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.4.6 Preparation of biomaterials for assay development				

	Muizen (<i>Mus musculus</i>)		20	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)		9	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Welzijnsaantastingen

3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters

Citaat: 10.1.c

transport and an acclimatisation period will be required before challenge.

Transport kan nodig zijn omdat er maar enkele laboratoria beschikbaar zijn met 10.2.g

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Selection of candidate vaccines

Cavia's (*Cavia porcellus*)

Citaat: Experiments to be conducted with females but we will look at the possibility to include males in the experiments as well (based on age at start and duration of the experiment).

3.4.4.2 Optimization of the challenge model

Syrische goudhamsters (*Mesocricetus auratus*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat: females, males if possible

Katten (*Felis catus*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Fretten (*Mustela putorius furo*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat: males and also females, female use dependent on age at start of experiment and duration.

3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters

Katten (*Felis catus*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Fretten (*Mustela putorius furo*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat: female use dependent on age at start of experiment and duration

Syrische goudhamsters (*Mesocricetus auratus*)

Citaat: Experiments to be conducted with females but we will look at the possibility to include males in the experiments as well (based on age at start and duration of the experiment).

3.4.4.4 Safety studies in cats and ferrets

Katten (*Felis catus*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Fretten (*Mustela putorius furo*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

3.4.4.5 Safety studies in non-target animals

Muizen (*Mus musculus*)

Citaat: For mice and rabbits, depending on the age only female animals will be included in studies because of the high risk of fighting in male animals. Since these experiments last for > 2 weeks, it is not acceptable to use males due to the animal welfare implications. Individual housing would be required to avoid injury (sometimes fatal or requiring euthanasia) and this is not recommended since these are social animals and it would be contrary to the refinement principles of the 3R's. In these studies, the functioning of the immune system is crucial and variation in the immune response caused by external factors will increase the variation in test results which would require more animals per group to reach statistically significant results. The sex of the animals to be tested is not specified in the scientific guidance and it is therefore not a regulatory requirement to test safety in both male and female animals.

Konijnen (*Oryctolagus cuniculus*)

Zie muizen + (citaat): Male rabbits can be used if the age of the rabbits does not exceed 12 weeks (around this age rabbits are sexually mature) during the study. Otherwise only female animals will be used because of a high risk of fighting by male animals.

Kippen

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Honden (*Canis familiaris*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Syrische goudhamsters (*Mesocricetus auratus*)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

3.4.4.6 Preparation of biomaterials for assay development

Muizen (*Mus musculus*)

Citaat: Only female animals will be included in studies because of a higher risk of fighting in male animals. Since these experiments last for 1-12 months it is not acceptable to use males, because they would need to be single housed which is not recommendable since these are social animals. Reduction of the risk of fighting by only using female animals also reduces stress and the negative effect stress can have on the height of antibody titers. Furthermore, the immune response of females including antibody production is better than in males. Therefore, females are preferably used for these studies.

Konijnen (*Oryctolagus cuniculus*)

Zie Muizen

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	De DEC heeft de aanvraag 45 vragen gesteld. Enkele vragen en antwoorden: 2) U noemt op enkele plaatsen ook de nerts. Zal het vaccin ook voor
-------------------	---

toepassing op nertsen worden ontwikkeld en met welke motivatie? Spelen de belangen van de nerts (gezondheid) en zijn eigenaar (financieel) in de nertsenhoudery een rol?

Antwoord: Nee, het vaccin wordt ontwikkeld voor huisdieren (kat, fret, mogelijk gebruik in hamsters en konijnen), niet voor landbouwhuisdieren (konijnen, nertsen). De nertsen sector is te klein en de toekomst is te onzeker om commercieel vaccin te ontwikkelen, dit is nooit een overweging geweest.

9) Kunt u telkens de keuze van de diersoort goed beargumenteren? De DEC acht less sentient geen goed argument. Alle zoogdieren worden wettelijk en ethisch gezien als even sentient.

Antwoord: Ik ben me ervan bewust dat er wettelijk geen verschil is. Het verschil zit met name in de beschikbaarheid van sommige diersoorten. Wanneer we naar (volwassen) SPF katten en fretten kijken speelt dit zeker een rol. Wanneer een andere diersoort voor serologie studies gebruikt kan worden (cavia) of als infectie model geschikt is (Syrian hamster), willen we deze diersoorten kunnen gebruiken om bijvoorbeeld de juiste vaccin kandidaat te kiezen. 10.1.c

diersoorten gebruikt worden, maar omdat we registratie nastreven voor kat en fret zullen registratie studies in deze target animals moeten plaatsvinden. Voor studies die niet in het dossier terecht komen 10.1.c kunnen we de andere diersoorten gebruiken. De aanvraag is aangepast en de term sentient is verwijderd. Appendix 1 is nu geschreven voor enkel cavia (verderop toegelicht bij vraag 17).

12) De humane eindpunten zijn in de bijlagen niet duidelijk omschreven. Welke klinische verschijnselen kunnen bij de verschillende diersoorten worden verwacht en wat is dan het bijbehorende humane eindpunt?

Antwoord: De humane eindpunten zijn nu verder toegelicht in de betreffende Appendices. De te verwachten symptomen, waarschijnlijk in een klein percentage van de dieren, zijn respiratoire verschijnselen (niezen, versnelde ademhaling en bij hamsters ook gewichtsverlies). Bij toenemende benauwdheid en ernstig gewichtsverlies is het humaan eindpunt bereikt. De humane eindpunten zijn op 3-6 opnieuw met de onderzoeker besproken, 10.1.c

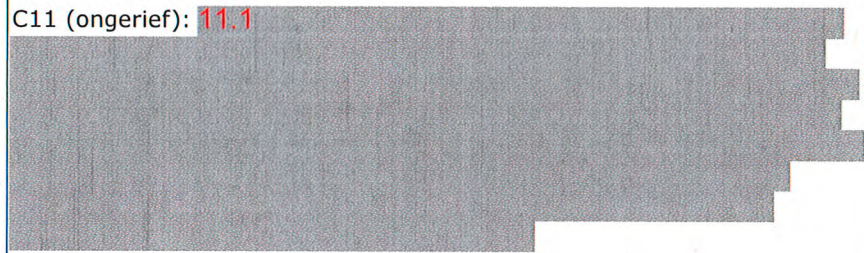
41) Een alternatief voor de monoclonale antistofproductie zou de phage-display-technologie kunnen zijn. Heeft u die overwogen?

Antwoord: Nee, dit is niet overwogen, maar nu ter sprake geweest. Als alternatief voor monoclonalen productie stellen we voor (Appendix 1) om milten van gevaccineerde cavia's te isoleren voor B-cel isolatie. Deze cellen kunnen gefuseerd worden tot hybridoma's en vervolgens kan via antigeen selectie een klonale cellijn uitgeselecteerd worden die antistoffen maakt. Dit kan een aantal dieren op Appendix 6 schelen. Vervolgvraag: De DEC vraagt zich af waarom de faag- display techniek niet is overwogen? De onderzoeker licht nog toe dat dit een ongelukkig antwoord is, het is niet overwogen omdat dit al veel eerder is besproken voor andere aanvragen als een niet gangbare techniek om snel antistoffen te ontwikkelen voor diagnostiek/lab onderzoek. Het gebruik van B-cellen van 'high responders' uit bijlage 1 voor hybridoma's is wel een goed alternatief en zal zeker aanleiding kunnen zijn voor minder aantallen dieren dan nu voorzien voor deze bijlage is de DEC van mening.


Citaten uit DEC advies:

C9 (hergebruik): In bepaalde gevallen worden dieren die eerder zijn gebruikt met maximaal matig ongerief hergebruikt in overleg met de dierenarts/IvD.


C11 (ongerief): 11.1



C13 (humane eindpunten): De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven 11.1



De DEC heeft met vraag 12 doorgevraagd over de humane eindpunten, die in eerste instantie nauwelijks waren beschreven. Het antwoord op deze vraag was naar de mening van de DEC nog niet specifiek genoeg. Hierop is een mondelinge toelichting gevraagd aan de onderzoeker. Deze heeft laten weten strikte humane eindpunten toe te passen, 10.1.c



[REDACTED]

C18 (geslachten): Voor bijna alle diersoorten geldt dat zowel mannetjes als vrouwtjes worden gebruikt. Maar er zullen deels (bijv. bijlage 5 en 6) alleen vrouwelijke konijnen en muizen gebruikt worden, omdat mannelijke dieren in groepshuisvesting vechten en daarom solitair gehuisvest zouden moeten worden. 11.1

[REDACTED]

C20 (hergebruik): Hergebruik is overwogen. In bepaalde experimenten kunnen eerder gebruikte dieren (met maximaal matig ongerief) opnieuw worden hergebruikt voor dit of een ander project. Na afloop van de experimenten zal (indien mogelijk) voor in leven gelaten honden, katten en fretten, bijv. naïeve controledieren, de mogelijkheid voor herplaatsing worden toegepast volgens de adoptieregeling.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat:

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk het ontwikkelen van een noodvaccin tegen SARS-Cov-2 voor katten en fretten, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Er vindt een deels beperkte en deels aanzienlijke aantasting plaats van het welzijn en de integriteit van 1.260 proefdieren, met maximaal voor 325 dieren licht, 891 dieren matig en 44 dieren ernstig ongerief (zie tabel [in DEC advies] voor specificaties) en een beperkte aantasting van hun integriteit.

Het onderzoek naar het nieuwe vaccin kan voor een relatief klein deel van de dieren leiden tot ernstig ongerief, 10.1.c

[REDACTED]

[REDACTED] De duur en de ernst van het ongerief worden door de onderzoekers zoveel mogelijk beperkt. Daar staat tegenover dat het onderzoek naar een noodvaccin tegen SARS cov-2 zal bijdragen aan het voorkomen van de ziekte bij katten en fretten, en van de ontwikkeling van een virusreservoir in katten en fretten dat nieuwe uitbraken bij dieren en mensen zou kunnen veroorzaken. 11.1 [REDACTED]

De aanvrager heeft een groot (economisch) belang bij het uiteindelijk op de markt kunnen brengen van dit noodvaccin, en kan dit alleen doen als hij door middel van de voorgestelde dierproeven kan aantonen dat het vaccin een beschermende werking heeft, en het geïnfecteerde dier niet bijdraagt aan verdere verspreiding onder de mens (voorkomen reservoir).

11.1 [REDACTED]

De DEC acht de economische belangen van de aanvrager op zich legitiem, en zij leggen zeker enig gewicht in de schaal, maar alleen in combinatie met het grote maatschappelijk belang en de voordelen voor de doeldieren rechtvaardigen ze het gebruik van de dieren in de experimenten.

3. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden zal dit project ertoe bijdragen dat er mogelijk een effectief vaccin ontwikkeld kan worden tegen SARS-CoV-2 voor toepassing in katten en fretten waarmee de vorming van een virusreservoir in deze dieren kan worden voorkomen en de dieren ook beschermt zijn tegen de klinische verschijnselen van de ziekte.

Volgens de DEC wegen de voordelen voor de (mondiale) volksgezondheid, doeldieren, de samenleving, de aanvrager en de eigenaren van de dieren zwaarder dan de nadelen voor de gebruikte proefdieren. Het project is goed opgezet en de aanvrager heeft voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en zal erop toezien dat deze toegepast worden. Gelet op het bovenstaande is de DEC unaniem van oordeel dat voor het project "Ontwikkelen van een noodvaccin tegen SARS-CoV-2 voor fretten en katten" het gebruik van de proefdieren gerechtvaardigd is.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij
- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Het DEC advies is Positief

11.1

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat: De DEC heeft uitgebreid stilgestaan bij de bedoelingen van de aanvrager, bijvoorbeeld of dit vaccin wellicht met name ontwikkeld zou worden voor de professionele nertsenhouderij, omdat daarvoor mogelijk een andere afweging zou worden gemaakt. Dit maakte de aanvraag kwetsbaar voor een kritische blik op de noodzaak: moeten we op dit moment in de tijd, waarin er nog geen vaccin voor mensen is, energie steken in het beschermen van katten en fretten? De DEC schat in dat het virus onvermijdelijk in bepaalde delen van de wereld onder mensen zal blijven circuleren en ook langs die route een voortdurende bron van nieuwe uitbraken hier kan zijn. Het relatieve aandeel van het dierlijke reservoir als oorzaak van nieuwe uitbraken is mogelijk niet heel groot. Na vragen van de DEC is het reservoir-argument beter onderbouwd. Het belang van de hoofddoelen samen, namelijk het dierlijk reservoir zoveel mogelijk indammen (volksgezondheid) én huisdieren (katten en fretten) beschermen tegen ziekte (diergezondheid), is ruim voldoende om de experimenten te rechtvaardigen. Ook de urgentie die op dit moment gevoeld wordt, is begrijpelijk. Men wil niet afwachten tot onomstotelijk vaststaat dat het dierlijke reservoir grote problemen veroorzaakt. De belangen die op het spel staan zijn daarvoor te groot.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. U heeft veel vragen gesteld die nodig waren om de aanvraag te kunnen beoordelen. In toekomstige gevallen zou u kunnen overwegen om aan de CCD aan te geven dat de aanvraag in de huidige vorm niet toetsbaar is (met benoeming van de nog openstaande vragen). In dit geval van spoedbehandeling van de aanvraag, was het gevolgde pad echter het meest efficiënt.

Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. Bij vraag C9 benoemt u wel dat een deel van de dieren wordt hergebruikt, maar niet de mening van de DEC hierover. Daarnaast is hergebruik alleen toegestaan wanneer zowel de voorgaande als de voorgestelde experimenten geen ernstig ongerief zullen veroorzaken. In dit geval is hergebruik dus niet toegestaan. Voor bijlage 3.4.4.3 heeft de aanvrager n.a.v. door ons gestelde vragen het ongerief bijgesteld naar matig. Hier is hergebruik wel mogelijk. Bij vraag C17 geeft u aan dat sprake is van wettelijk vereist onderzoek, maar niet of u voldoende overtuigd bent dat onderliggend onderzoek geen herhaling van eerder uitgevoerd onderzoek is.

U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. Ook heeft u aandacht besteed aan punten die volgens u aandacht behoeven. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

Wij danken u voor de snelle en zorgvuldige afhandeling van deze aanvraag, met een helder en goed onderbouwd advies.

4 Inhoudelijke beoordeling

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat: The goal of the project is the development of an emergency vaccine and later a fully licensed vaccine that fulfils the important unmet need for SARS-CoV-2 disease control in both cats and ferrets, 10.1.c</p> <p>[REDACTED]</p> <p>We aim to generate the serological, efficacy and safety data to be included in marketing authorization applications (registration dossiers) for this vaccine. This includes proof of concept (i.e. induction of protection combined with an acceptable safety profile), and the efficacy and safety studies to be undertaken as described in this proposal to fulfil the regulatory requirements.</p> <p>Citaat: The objective is achievable for the following reasons: Koch's postulates have been fulfilled for the pathogen, and the genetic sequence has been obtained. 10.1.c</p> <p>[REDACTED]</p>
<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat: Importantly, the new vaccine will reduce animal suffering from SARS-CoV-2 infection (respiratory symptoms, pathology in the upper respiratory tract). Consequently, vaccination will benefit animal welfare and healthcare for cats and ferrets in general.</p> <p>The new vaccine should also reduce or ablate shedding of SARS-CoV-2 by cats and ferrets, so that these animals (and related mustelids like minks) do not contribute to further spread of the virus in the human population, with devastating consequences. Furthermore, these species then cannot longer act as a reservoir for SARS-CoV-2. The vaccine thus contributes to control of a zoonotic virus infection.</p> <p>Vaccines are the most effective method for control, prevention or eradication of infectious diseases. The SARS-CoV-2 pandemic shows that in the absence of vaccination, control of respiratory viruses is complicated if not impossible in our current society. The prospects are that yet to be developed human and animal vaccines enable disease control so that other control measures such as social distancing, home isolation and the use of surgical face masks are no longer necessary, and society can return to normal functioning.</p>
<p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>11.1</p> <p>[REDACTED]</p>

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat uit DEC advies (C7): De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en infrastructuur 10.1.c beschikt om de doelstelling van het onderzoek binnen de gevraagde termijn te realiseren.</p> <p>10.1.c et gebruik van B-cellen van dieren uit bijlage 1 voor de ontwikkeling van B-cel hybridoma's voor de productie van antistoffen, die nodig zijn om in het laboratorium verder onderzoek te doen, zal daar ook aan kunnen bijdragen.</p> <p>11.1</p>
---	---

3V's

Vervanging	
	3.4.4.1 Selection of candidate vaccines: Citaat Guinea pigs are used for serology studies because there are no suitable in vitro alternatives or models for testing antigenicity. The vaccine is developed for cats and ferrets but use of guinea pigs of a less sentient species is suited for the purpose of serology/candidate selection.
	3.4.4.2 Optimization of the challenge model: Citaat: Cats and ferrets must be used for these studies because ultimately these are the species for which the vaccines are tended to induce protection. Therefore, infection models have to be developed in the target animals. Syrian hamsters are also a target species of the virus, but for this species it is not intended to obtain a label claim for a licensed vaccine.
	3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters: Citaat: Cats and ferrets must be used for these studies because there are no suitable alternatives or models for the induction of immunity in a whole organism or for the colonization of living tissues as complex as those found in the whole animal for which these vaccines are intended to induce protection. The use of the target animal is specified in the Ph.Eur. or other legislations. It is possible to test vaccine candidates in Syrian hamsters as a target species for initial selection based on efficacy, without the intention to obtain a full licence and with minimal animal use.
	3.4.4.4 Safety studies in cats and ferrets: Citaat: Cats and ferrets must be used for these studies in accordance with international regulations. For these safety investigations, the number of animals to be used are mostly specified and all measures will be taken to meet the mandatory requirements of the regulatory authorities.
	3.4.4.5 Safety studies in non-target animals: Citaat: It is a regulatory requirement that the safety of a vaccine is assessed in non-target species that share the same ecosystem/habitat as cats and may come into contact with the vaccine strain.
	3.4.4.6 Preparation of biomaterials for assay development: Citaat: Animals must be used for these studies because there are no suitable alternatives or models for the production of antibodies and antisera. Antibodies and antisera that are being generated in the experiments described here are essential for the development and use of alternative immunological/serological tests for detection/quantification purposes and reduction/replacement of challenge studies. Attempts will be made to develop and use in vitro tests for potency testing, no animals are requested for in vivo potency tests.
Verminderen	

	<p>3.4.4.1 Selection of candidate vaccines: Citaat: The numbers of animals used have been reduced to six per group based on the outcome of similar experiments, without endangering the scientific integrity of the work. This will be evaluated in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. According to internal procedures, each study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and if required a statistician.</p>
	<p>3.4.4.2 Optimization of the challenge model: Citaat: The numbers of animals used will be reduced wherever possible without endangering the scientific integrity of the work. 10.1.c</p> <p>[Redacted]</p>
	<p>3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters: Citaat: The number of animals used will be reduced wherever possible without endangering the scientific integrity of the work. Study protocols will be designed to combine the collection of data on as many different parameters as possible within a study in order to minimise the total number of animals used. Where possible the same control group will be used for multiple comparisons in order to reduce the number of animals required. The minimum numbers of animals required in safety and efficacy studies are set out in the European Pharmacopoeia and EMA guidelines. In many cases, the number of animals stipulated by the guidelines is small. 10.1.c</p> <p>[Redacted]</p> <p>[Redacted] at least solid guidelines are now available through literature for challenge models for cats and ferrets and Syrian hamsters. 10.1.c</p> <p>[Redacted]</p> <p>As indicated above animals will be re-used where possible, keeping animal welfare in mind without endangering the scientific integrity of the work.</p>

	<p>3.4.4.4 Safety studies in cats and ferrets: Citaat: If the number of animals required is not specified in the relevant legislation, they will be reduced wherever possible without endangering the scientific integrity of the work. 10.1.c</p> <p>For these studies, the number of animals used will be the minimum number required to demonstrate a statistical difference between the vaccine and control groups. Usually, this will be circa 10 vaccinates and 5 controls. The number of animals per study will be detailed in each study protocol. 10.1.c</p> <p>Animals will be re-used where possible, keeping animal welfare in mind without endangering the scientific integrity of the work.</p>
	<p>3.4.4.5 Safety studies in non-target animals: Zie 3.4.4.4.</p>
	<p>3.4.4.6 Preparation of biomaterials for assay development: Citaat: The number of animals required for generation of polyclonal antibodies depends on amount of material that is required to run the tests. 10.1.c</p>
<p>Verfijnen</p>	
	<p>3.4.4.1 Selection of candidate vaccines: Citaten: 10.1.c</p> <p>The classic method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, the immune responses measured in guinea pig vaccine recipients will be of value in the follow up efficacy studies for which antigens need to be selected, there is extensive evidence of the predictive value of antigen selection in this species in connection to the emergency vaccination platform in both farm- and companion animals. In general, animals will be closely monitored.</p> <p>(...) In order to prevent undue stress during blood sampling in guinea pigs, general anaesthesia will be applied using licensed agents and dosing regimens developed under guidance of a veterinarian.</p> <p>(...)</p>
	<p>3.4.4.2 Optimization of the challenge model: Citaten: Cats and ferrets are the animal species that the vaccine is intended to be ultimately applied to, Syrian hamsters can be regarded sentient model species for the cat or ferret disease. 10.1.c</p>

[REDACTED]

The classic method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, the immune responses measured in the vaccine recipients will be assessed in each orientating efficacy study. If immunological correlates of protection (e.g. a serological response) can be used to prove efficacy this will be used rather than challenge tests in further studies. When a challenge model has to be used, humane end-points will be employed and staff will be fully trained to recognize animals that experience discomfort. Animals will be closely monitored, and extra checks will be made to ensure that no animal is left suffering.

10.1.c

[REDACTED]

After animals have arrived from the suppliers, handling of the animals for sampling procedures specific for the study to be performed is trained by qualified personnel.

(...) In order to prevent undue stress during blood sampling in ferrets and cats, sedation will be used. Sedation will be carried out using licensed agents and dosing regimens developed under guidance of a veterinarian.

For monitoring of the clinical health status of Syrian hamsters, cats and ferrets, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. The frequency of observation will be increased after challenge in anticipation of possible clinical symptoms of disease. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded.

In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed by a veterinarian.

Infection studies using a challenge model will require that all animals are exposed to SARS-CoV-2. This likely results in clear clinical symptoms in unvaccinated control animals. When it is clear that the clinical picture of the disease agent has been established, the scientific endpoint is reached and subsequently these animals will be euthanized. In some cases, the scientific and the humane endpoint are reached simultaneously at which point these animals will be euthanized. Consequently, the level of severity for the challenge studies will be mild to severe. When it is clear that continuation would not provide any additional scientific data, every effort will be made to euthanise the animal before the humane endpoint is reached.

3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters:

Citaten: Regulations and guidelines determine to a large extent what kind

of data must be generated and, to a large extent, this determines what form of models and methods should be employed.

The classical method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, if immunological correlates of protection (e.g. a serological response) can be used to prove efficacy this will be used rather than challenge tests. When a challenge model is mandated, clearly defined humane endpoints will be applied and staff will be fully trained to recognize animals that are experiencing discomfort. Animals will be closely monitored and frequent checks will be made to ensure that no animal is left suffering.

Where challenge efficacy studies are mandated, clearly defined humane endpoints specific to the pathogen will be described and the frequency of observation will be increased during any anticipated critical period. Throughout all challenge phases, the welfare of the animals will be monitored by experienced animal technicians under the care of the attending veterinarian. Animals will be euthanised before reaching the humane endpoint when it is clear that continuation would not provide any additional scientific data. After animals have arrived from the suppliers, handling of the animals for sampling procedures specific for the study to be performed is trained by qualified personnel.

An ongoing assessment of the challenge models used will be undertaken. We will try to find a correlation between changes in relevant parameters and the (start of) clinical signs. If the results are acceptable for regulatory submission, a validated change in biochemical/haematological parameter(s) can be implemented so that an earlier scientific endpoint can be determined with fewer clinical signs (and therefore discomfort). X-ray examination/ultrasound if possible, if available at the facilities, is another example of refinement with regard to determining the scientific end point earlier.

(...) In order to prevent undue stress during blood sampling in ferrets and cats sedation will be used (ferrets: always, cats: if handling without sedation is impossible). Sedation will be carried out using licensed agents and dosing regimens developed under guidance of a veterinarian.

10.1.c

in certain circumstances, it will be advantageous to both animal welfare and scientific consistency to make the decision to use sedation for certain procedures.

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked once daily by a certified person. The frequency of observation will be increased after challenge in anticipation of possible clinical symptoms of disease. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily

	<p>observations are recorded. In case of any unexpected event, a veterinarian will be consulted to ensure appropriate veterinary care. Few, if any, adverse reactions are expected in the majority of animals during vaccinations, and small volumes (keeping the age of the animal in consideration) of blood will be sampled. These procedures are minimally invasive. Efficacy studies using a challenge model however will require that all animals are exposed to the disease agent SARS-CoV-2. This may result in clear clinical symptoms in unprotected animals. When it is clear that continuation would not provide any additional scientific data, every effort will be made to euthanise the animal before the humane endpoint is reached.</p>
	<p>3.4.4.4 Safety studies in cats and ferrets: Citaten: International regulations determine to a large extent what sort of data must be generated and this determines which methods have to be employed</p> <p>(...) The procedures being carried out are routine vaccinations, minimally invasive swabbing and the taking of small blood samples. In order to prevent undue stress during blood sampling in ferrets and cats sedation will be used. Sedation will be carried out using licensed agents and dosing regimens developed under guidance of a veterinarian. 10.1.c</p> <p>in certain circumstances, it will be advantageous to both animal welfare and scientific consistency to make the decision to use sedation for certain procedures.</p> <p>(...)</p>
	<p>3.4.4.5 Safety studies in non-target animals: Citaten: European regulations determine to a large extent what sort of data must be generated and this determines which methods have to be employed.</p> <p>(...) In certain circumstances, it will be advantageous to both animal welfare and scientific consistency to make the decision to use sedation for certain procedures.</p>
	<p>3.4.4.6 Preparation of biomaterials for assay development: Citaat: Following the codes of practice for immunization is the basis for refinement in these animal procedures.</p>

3.4.4.1 Selection of candidate vaccines: [REDACTED].	
3.4.4.2 Optimization of the challenge model: 11.1 [REDACTED].	
3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters: 11.1 [REDACTED]	
3.4.4.4 Safety studies in cats and ferrets: 11.1 [REDACTED]	
3.4.4.5 Safety studies in non-target animals: 11.1 [REDACTED]	
3.4.4.6 Preparation of biomaterials for assay development: De aanvrager wordt nog gevraagd beter te onderbouwen waarom non-animal based technieken niet mogelijk zijn, conform het recent verschenen ECVAM-rapport.	
Wettelijk vereist onderzoek Indien ja, is er sprake van herhaling?	Er is sprake van wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie.
3.4.4.1 Selection of candidate vaccines: Citaat: For novel pathogens like SARS-CoV-2, serology and vaccine dose-response studies are essential for vaccine development. 10.1.c [REDACTED]	
3.4.4.2 Optimization of the challenge model: Citaat: For novel pathogens like SARS-CoV-2, infection (challenge) model setup is essential for vaccine development. 10.1.c [REDACTED] [REDACTED] Until the moment a serological correlate of protection is identified, challenge models have to be used to test vaccine efficacy. Challenge models will be improved and refined on the basis of the current scientific literature or experience within the company, our external partners or our CROs.	
3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters: Citaat: 10.1.c [REDACTED] [REDACTED] a number of the safety and efficacy studies done with the individual products then have to be repeated with the vaccines administered together according to international regulations and guidelines.	
3.4.4.4 Safety studies in cats and ferrets: Citaat: 10.1.c [REDACTED] [REDACTED] a number of the safety and efficacy studies done with the individual products then have to be repeated with the vaccines administered together according to international regulations and guidelines.	
3.4.4.5 Safety studies in non-target animals: Zie 3.4.4.3	
3.4.4.6 Preparation of biomaterials for assay development: Citaat: Only in case no hybridoma or a reliable supply of polyclonal antibodies is available, 10.1.c [REDACTED]	

Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	---

3.4.4.1 Selection of candidate vaccines: Citaat: Guinea pigs originating from a previous test for a different antigen, if available, can be re-used.
3.4.4.2 Optimization of the challenge model: Citaat: For research on novel pathogens such as SARS-CoV-2, cats and ferrets from previous studies can be re-used if available and sero-negative (highly likely)
3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters: Citaat: For research on novel pathogens, animals from previous studies can theoretically be re-used if seronegative, with regard to the species in this Appendix, cats and ferrets can be reused if available
3.4.4.4 Safety studies in cats and ferrets: Re-use is acceptable if the immunological status of the animals allows. Applicable for cats and ferrets.
3.4.4.5 Safety studies in non-target animals: Citaat: All species mentioned above originating from experiments that do not interfere with the purpose of the safety studies can be used for these safety studies.
3.4.4.6 Preparation of biomaterials for assay development:

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Selection of candidate vaccines	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2 Optimization of the challenge model	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.4 Safety studies in cats and ferrets	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.5 Safety studies in non-target animals	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.6 Preparation of biomaterials for assay development	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Selection of candidate vaccines	HEP: Worden niet verwacht	
Cavia's (Cavia porcellus)	Ongerief: 5,0% Ernstig 95,0% Matig	

3.4.4.2 Optimization of the challenge model

HEP: In the published ferret model (Richard et al., 2020), all inoculated and the majority of sentinel ferrets acquired the infection and showed no or mild symptoms as described above. The cat model of Shi et al., 2020 showed similar results for cats. The Syrian hamster model of Fuk-Woo Chan et al. (2020) showed moderate symptoms in inoculated animals, including respiratory symptoms and weight loss, from which the animals recovered. We keep 10% severe discomfort in this Appendix as a safety precaution because current literature is too sparse to be able to exclude severe discomfort, but it underlines that the expected

Citaat: The specific humane endpoints are severe weight loss and / or respiratory distress. In addition, general humane endpoints (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight, pain) are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment. The description and improvement of specific humane endpoints **10.1.c** [redacted] n active approach will be taken to improve and adjust humane endpoints based on experience during the studies.

	percentage is low.	
Syrische goudhamsters (Mesocricetus auratus)	Ongerief: 11,0% Ernstig 56,0% Matig 33,0% Licht	
Katten (Felis catus)	Ongerief: 11,0% Ernstig 89,0% Matig	
Fretten (Mustela putorius furo)	Ongerief: 11,0% Ernstig 89,0% Matig	
3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters	HEP: We expect, based on present literature and the fact that we anticipate to gain experience with the challenge model in studies described in Appendix 2 and through collaborations/new published studies, that none of the animals in this study will experience severe discomfort.	Citaat: At present it is not possible to define specific humane end points for SARS-CoV-2 in cats and ferrets, as much remains unknown in this stage about clinical effects. While building this knowledge, the specific humane endpoints defined are severe weight loss and / or respiratory distress. Mild respiratory symptoms such as difficulty breathing, sneezing, ocular discharge, and enteric symptoms such as vomiting and diarrhoea are transient and animals recover.
Katten (Felis catus)	Ongerief: 100,0% Matig	
Fretten (Mustela putorius furo)	Ongerief: 100,0% Matig	
Syrische goudhamsters (Mesocricetus auratus)	Ongerief: 4,0% Ernstig 41,0% Matig 55,0% Licht	

3.4.4.4 Safety studies in cats and ferrets	HEP: Worden niet verwacht	
Katten (<i>Felis catus</i>)	Ongerief: 100,0% Matig	Citaat: Few adverse reactions are expected in the majority of animals since the procedures that are being carried out are routine vaccinations and small volumes (keeping the age of the animal in consideration) of blood will be sampled. These procedures are minimally invasive but repeated sedation is required. Consequently, the level of severity for the safety studies will be moderate (100%). It is to be expected that a number of cats can be sampled without sedation, for these cats final discomfort scores would be mild.
Fretten (<i>Mustela putorius furo</i>)	Ongerief: 100,0% Matig	Citaat: Few adverse reactions are expected in the majority of animals since the procedures that are being carried out are routine vaccinations and small volumes (keeping the age of the animal in consideration) of blood will be sampled. These procedures are minimally invasive but repeated sedation is required. Consequently, the level of severity for the safety studies will be moderate (100%). It is to be expected that a number of cats can be sampled without sedation, for these cats final discomfort scores would be mild.
3.4.4.5 Safety studies in non-target animals	HEP: Worden niet verwacht	
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	Ongerief: 100,0% Licht	
Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Ongerief: 100,0% Licht	
Kippen	Ongerief: 100,0% Licht	
Honden (<i>Canis familiaris</i>)	Ongerief: 100,0% Licht	
Syrische goudhamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>)	Ongerief: 100,0% Licht	
3.4.4.6 Preparation of biomaterials for assay development	HEP: Worden niet verwacht	

Muizen (<i>Mus musculus</i>)	Ongerief: Licht	
Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Ongerief: 100,0% Licht	

Opmerkingen over de dierproeven

Naam proef	Opmerkingen
3.4.4.1 Selection of candidate vaccines	
3.4.4.2 Optimization of the challenge model	
3.4.4.3 Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters	
3.4.4.4 Safety studies in cats and ferrets	
3.4.4.5 Safety studies in non-target animals	Een deel van de hamsters kan worden gebruikt uit bijlage 3.4.4.2/3.4.4.3.
3.4.4.6 Preparation of biomaterials for assay development	

5 Samenvatting

11.1

De humane eindpunten zijn nog niet volledig uitgewerkt, vanwege de onbekendheid van de aanvrager met de modellen. De DEC heeft hierbij stilgestaan en heeft vertrouwen in de juiste invulling van de humane eindpunten gedurende de loop van het project. 11.1

De aanvrager geeft aan beide geslachten in te zetten, met uitzondering van experimenten met muizen, konijnen en hamsters. De voornaamste reden hiervoor is het vechten van mannelijke dieren bij langdurige studies. Dit argument is vaker akkoord bevonden bij de CCD.

De aanvrager geeft in bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 aan dat dieren kunnen worden hergebruikt. Gezien het ernstige ongerief bij een deel van de dieren in deze bijlagen, is hergebruik niet toegestaan. De aanvrager is nog gevraagd dit nader te onderbouwen.

De aanvrager heeft n.a.v. deze vraag aangegeven in bijlage 3.4.4.2 geen

dieren te hergebruiken. Voor bijlage 3.4.4.3 heeft de aanvrager het ongerief bijgesteld naar maximaal matig. Zij gaan er hierbij vanuit dat ze in bijlage 3.4.4.2 voldoende ervaring opdoen met het model, dat voor de proeven in bijlage 3.4.4.3 ernstig ongerief voorkomen kan worden.

In bijlage 3.4.4.3 worden dieren gevaccineerd 10.1.c

11.1

e aanvrager is gevraagd dit nader te onderbouwen.

De aanvrager heeft aangegeven dat dit een geconditioneerd transport betreft van maximaal 1,5 uur onder SPF condities. Dit transport is noodzakelijk om de dieren van 10.1.c naar 10.1.c te vervoeren. Dit wordt zo uitgevoerd om de druk op de 10.1.c (die momenteel hoog is) te beperken.

11.1

In de aanvraag wordt op enkele plaatsen gesproken over nertsen. De DEC heeft vragen over gesteld aan de aanvrager over of de doelstelling van dit project ook het ontwikkelen van vaccins voor nertsen zal omvatten, omdat dit een andere ethische afweging zou vergen. De aanvrager geeft aan onder dit project geen vaccins voor nertsen te willen ontwikkelen.

De aanvrager heeft in antwoord op de door het Secretariaat gestelde vragen uitgelegd waarom zij gekozen hebben voor een vaccin voor katten en fretten. Het is niet uitgesloten dat de ontwikkelde vaccins ook voor nertsen kunnen worden ingezet. Dit is echter niet de doelstelling van dit project.

In bijlage 3.4.4.6 wil de aanvrager een klein aantal dieren gebruiken voor het maken van hybridoma die monoclonale antilichamen produceren. De aanvrager heeft de noodzaak om de antilichamen/B-cellen in vivo op te wekken, uitgelegd (zie vergaderstuk AVD20209944g). 11.1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

11.1

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2026 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project Ontwikkeling van een SARS-CoV-2 vaccin voor katten en fretten
- 1.2 Looptijd van het project 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) Vaccin, coronavirus, kat, fret, immuniteit

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
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Dit project betreft de ontwikkeling van een nieuw vaccin tegen SARS-CoV2 voor katten en fretten. Deze dieren kunnen net als mensen het SARS-CoV2 bij zich dragen en verspreiden. In het project worden studies beschreven die noodzakelijk zijn om aan eisen voor Europese en internationale productregistratie te voldoen. Hierbij worden dierexperimenten uitgevoerd om de juiste vaccin kandidaat te selecteren en te testen op bescherming en veiligheid. Bij de ontwikkeling worden experimenten uitgevoerd in diersoorten die in contact kunnen komen met katten en fretten om veiligheid te garanderen.
- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Vaccinatie is de meest effectieve methode **ter voorkoming en eliminatie** van infectieziekten in dieren en mensen, zeker als het **een virus** betreft **dat** zowel mensen als dieren ziek maakt **zoals SARS-CoV-2, het virus dat COVID-19 veroorzaakt**. Een vaccin voor (huis)dieren draagt bij aan **het voorkomen van ziekte** bij mensen, omdat overbrenging door deze dieren verminderd of uitgesloten kan worden.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- Onderzoeksfase:
Hamsters, cavia's of konijnen: 180
- Testen in doeldieren:
Katten: 321
Fretten: 321
Hamsters: 171*

*Hamsters zijn gevoelige dieren voor SARS-CoV-2 maar het is niet het doel het vaccin voor deze diersoort te registreren. Het infectiemodel kan wel in hamsters getest worden om het aantal fretten en katten te beperken.

Testen in andere dieren:

Muizen: 65
Konijnen: 57
Kippen: 45
Hamster: 45
Honden: 45

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

De dieren ondervinden **licht** ongerief van de entingen en bemonsteringen (b.v. bij bloedafname, neusswab). **Vanwege** herhaalde bemonstering **en de noodzaak om dieren bij bemonstering onder verdoving te brengen** wordt het ongerief als **voornamelijk** matig ingeschaald. **Om werkzaamheid van het (kandidaat) vaccin te testen wordt aan niet-gevaccineerde en gevaccineerde dieren SARS-CoV-2 krijgen toegediend. In deze studies moeten ook een minimaal aantal niet-gevaccineerde dieren deze ziekteverwekkers toegediend krijgen waardoor ze ziek worden.** Hierbij zullen de ongevaccineerde dieren voor een korte periode licht, matig of in enkele gevallen ernstig ongerief kunnen ondervinden **omdat ze niet beschermd zijn en ziek worden**. Net als bij mensen geldt dat veruit de meeste dieren slechts milde of matige symptomen laten zien bij een SARS-CoV-2 infectie. **Deze test is helaas noodzakelijk om werkzaamheid van het vaccin aan te tonen.**

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

Onderzoeksfase:

Cavia's **of hamsters of konijnen**

Aantal: 180

Licht: 0%

Matig: 95% **indien voor Cavia's gekozen wordt**

Ernstig: 5%

Testen in doeldieren:*

Katten:

Aantal: 321

Licht: $\geq 0\%$

Matig: $\leq 97\%$

Ernstig: $\leq 3\%$

Fretten:

Aantal: 321

Licht: $\geq 0\%$

Matig: $\leq 97\%$

Ernstig: $\leq 3\%$

Hamsters*

Aantal: 171

Licht: $\geq 40\%$

Matig: $\leq 51\%$

Ernstig: $\leq 7\%$

* Hamsters zijn gevoelige dieren voor SARS-CoV-2 maar het is niet het doel het vaccin voor deze diersoort te registreren. Het infectiemodel kan in hamsters getest worden om het aantal fretten en katten te beperken.

Testen in contactdieren + werving biomaterialen:

Muis:

Aantal: 65

Licht: 100%

Konijn:

Aantal: 57

Licht: 100%

Kip:

Aantal: 45

Licht: 100%

Hamster

Aantal: 45

Licht: 100%

Hond

Aantal: 45

Licht: 100%

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Waar mogelijk worden katten, honden, fretten en konijnen na **afloop** van een studie hergebruikt of ter adoptie aangeboden. Voor cavia's, hamsters, muizen en kippen is dit niet het geval, deze zullen aan het einde van een studie worden gedood. Ernstig zieke dieren of dieren waarbij het welzijn onverwacht is aangetast **krijgen euthanasie volgens geaccepteerde methoden. Dit geldt ook voor dieren die om wetenschappelijke redenen gedood moeten worden.**

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.

De werkzaamheid **van een vaccin** hangt af van de afweere**ontwikkeling die in** reactie **die** door het immuunsysteem van het dier gemaakt wordt. **Is die goed, dan zal een latere infectie met de ziekteverwekker, SARS-CoV-2, overwonnen worden.** Dit is een dermate complex systeem dat er geen betrouwbare vervangende in vitro test voor is.

De afweerreactie is waarschijnlijk afhankelijk van zogenaamde Als de productie van antilichamen die tegen het virus gemaakt worden. Als we die kunnen meten en ze een voorspellende waarde hebben voor het succes van vaccinatie, voldoende correleert met bescherming en de regelgevende instanties deze in-vitro test accepteren, hoeven er geen of minder infectiestudies te worden uitgevoerd.

4.2 Vermindering

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

Voordat vaccins worden getest in dieren, worden ze eerst uitvoerig getest **in-vitro** in het laboratorium. **Alleen de meest veelbelovende vaccinkandidaten zullen worden getest in dieren. Deze testen** worden in overleg met (Europese) overheden bepaald. Daarnaast worden dieren, indien mogelijk, opnieuw ingezet met in acht neming van dierenwelzijn.

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.

Bij vaccinontwikkeling **voor dieren** wordt veiligheid en werkzaamheid van een product aangetoond in het dier waar het vaccin voor bedoeld is. Daarnaast moet in het geval van genetisch gemodificeerde organismen-gebaseerde vaccins de veiligheid worden aangetoond in diersoorten waarmee het doeldier in aanraking kan komen **(hond, muis, kip, konijn).**

Als pijnstilling niet interfereert met het experiment zal **zo'n** behandeling worden toegepast. Daarnaast worden er bij alle dierproeven vooraf vastgestelde humane eindpunten gehanteerd om het ongerief en lijden van dieren zo veel mogelijk te beperken.

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

De instelling beschikt over **adequate** gebouwen en voorzieningen om in de huisvestingsbehoefte van betreffende diersoorten te voorzien en om de procedures **efficiënt** uit te voeren met zo min mogelijk stress bij de dieren. Alle dieren worden in groepen gehuisvest en beschikken over afleidingmateriaal passend bij de diersoort zodat de dieren **hun normale** gedrag kunnen uitvoeren. Alle **biotechnische** handelingen en de dagelijkse verzorging van de dieren worden gedaan door gediplomeerde en ervaren medewerkers. Voor de controle **op** dierenwelzijn beschikt de instelling over een Instantie voor Dierenwelzijn en gekwalificeerde dierenartsen waardoor passende **veterinaire** zorg altijd beschikbaar is.

10.2.g

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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).
- 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'.

10.2.g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Selection of candidate vaccines

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.

10.1.c

In this way, a pre-selection of candidate vaccines can be made. For this purpose, **serology** models are set up that help to evaluate candidate vaccines. The study will normally include one or more of the following procedures:

- Application of the antigen, and booster(s)
- Monitoring of changes in general health (no clinical signs expected because all vaccine platforms should be safe. Can be made part of the non-target animal safety studies required).
- Confirmation of absence of vaccine shedding or dissemination (swabbing of mucosal surfaces (including nose swabs), testing of faecal/urinal samples, in case non-replicating viruses or non-pathogenic viruses are used)
- Blood sampling for serology
- Post-mortem examination (in case non-replicating viruses or non-pathogenic viruses are used as platform technology)

A necropsy may be performed to determine the presence of gross or histologic lesions and/or take samples to detect the presence of the vaccine. The severity of discomfort will be limited because no clinical disease is expected, discomfort is caused by repeated blood sampling and swabbing.

10.2.g

10.1.c

As it is important to select the antigen with the optimal serological response (indications are that serology correlates with protection to SARS-CoV-2), and at the same time to work with the lowest number of animals possible in these experiments, we base **statistic design** of our serological test on present knowledge **10.1.c**. The present tests are to be performed in guinea pigs ~~or Syrian hamsters or rabbits (one model to be chosen)~~. **10.1.c**

Once an antigen has been selected based on serology results obtained, a **vaccine dose – response** study will be initiated in the target animals (cats, ferrets). Such vaccine dose-response study can be combined with a challenge experiment as described in Appendix 3.

10.1.c

Parameters to be measured are serological responses, **total antibody response and neutralizing antibody response** ~~but this type of experiments can simultaneously be used to determine safety in non-target animals of the SARS-CoV-2 vaccine candidate.~~

Animals will be euthanized at the end of the experiment for serum collection, **spleen isolation** and if deemed necessary post mortem examination **for examination of the safety profile**. **Importantly**, this serum can be used in diagnostic assays and potentially limits the use of animals as described in Appendix 6. **Furthermore, spleens of the guinea pigs can be processed for B-cell isolation, so that monoclonal antibodies can be generated, which reduces animal use in Appendix 6.**

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

Two or more of the following procedures will be employed for study of **serological response** to SARS-CoV-2 antigens in guinea pigs ~~or Syrian hamsters or rabbits~~.

1. Application of the antigen, booster(s) (intramuscular, subcutaneous, oral, nasal, intravenous, ocular, intra-peritoneal (1 – 5 x))
2. Daily observation (*min 1x – daily*)
3. Weighing (1 – 5 x)
4. Blood sampling (**heart puncture**, including anaesthesia) to determine immunological parameters and/or to determine the presence of the vaccine antigen in the blood (1 – 6 x)
5. Swabbing of (mucosal) surfaces (oral/nasal/ocular/rectal/vaginal) to determine excretion of the vaccine strain (1 – 6 x)
6. Euthanasia

The duration of all procedures described above will only be minutes and will be applied in accordance with "handboek proefdierkunde", van Zutphen et al.,2016.

The length of the observation period after application will be 9 weeks.

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

The number of animals used in this type of study will be the smallest group size possible (6) given the fact that statistically relevant differences between the serological titers have to be determined. At present, **limited** data are available of SARS-CoV-2 antibody titers and variation thereof in animal species, and for that reason no power calculations can be made for group size **determination**. **10.1.c**

10.1.c the serology experiment, knowledge of the variance will be obtained and used for sample size calculation for future experiments, including the vaccine dose-response study, possibly leading to adjustment in group size.

10.2.g

B. The animals

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

Serology/antigen selection:

Guinea pigs ~~or Syrian hamsters or Rabbits~~: *only one of these species to be chosen for studies*

Purchase of animals:

SPF guinea pigs, ~~Syrian hamsters and rabbits~~ (–) will be purchased from licensed commercial vendors. Experiments to be conducted with females but we will look at the possibility to include males in the experiments as well (based on age at start and duration of the experiment).

Age of animals:

Guinea pigs: 4 weeks **to adult** / approximately 250-350 g body weight @ 4 weeks

~~Syrian hamster~~: > 4 weeks

~~Rabbit~~: > 6 weeks / **approximately 1 kg**

Both young and adult animals qualify for inclusion if the serological status allows. There is no maximum age although one has to realize that humoral immunity declines in older animals.

Numbers:

Guinea pigs ~~or Syrian hamsters or Rabbits~~:

- 6 animals per antigen candidate tested
- 2 variants **10.1.c** used
- 10 antigens to be tested (10 different antigens and 2 different platforms → max 120 animals)
- A negative control group has to be included per 5 antigen/platform combinations tested (→ max 24 animals)
- Repetition of an experiment in case of unexpected events during the test that invalidate results: 5 groups plus negative control (→ max 36 animals)

Total max 180.

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.

Guinea pigs ~~and rabbits~~ originating from a previous test for a different antigen, **if available, can be re-used. Age may be a factor in qualifying animals for re-use.**

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:

Guinea pigs/~~Syrian hamsters/rabbits~~ are used for serology studies because there are no suitable in vitro alternatives or models for testing antigenicity. The vaccine is developed for cats and ferrets but **use of guinea pigs of a less sentient species** is suited for the purpose of serology/candidate selection.

Reduction:

The numbers of animals used have been reduced to six per group based on the outcome of similar experiments, without endangering the scientific integrity of the work. This will be evaluated in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. **10.1.c**

10.2.g

Refinement:

Regulations and guidelines determine to a large extent what kind of data must be generated and, to a large extent, this determines what form of models and methods should be employed.

The classic method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, the immune responses measured in guinea pig vaccine recipients will be of value in the follow up efficacy studies for which antigens need to be selected, 10.1.c

In general, animals will be closely monitored.

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

Guinea pigs, Syrian hamsters and rabbits are always housed socially. Furthermore, to enhance animal welfare three major criteria are taken into account: 1) social interaction, 2) access to food and 3) the possibility of moving freely. Programs are in place for the housing and caring of animals exposed experimentally to pathogens, with emphasis on management and safety practices for containment (according to the regulations of Biosafety level 1 – 3).

An active approach to providing environmental enrichment will be taken. This will enable animals to express their species-specific behavioural repertoire. Appropriate and multiple objects that allow comfortable resting and play materials will be provided, and new ideas for improving the general wellbeing of the animals encouraged and implemented when and where appropriate.

The procedures being carried out are routine vaccinations, minimally invasive swabbing and the taking of small blood samples. In order to prevent undue stress during blood sampling in guinea pigs, general anaesthesia will be applied using licensed agents and dosing regimens developed under guidance of a veterinarian.

For monitoring of the clinical health status, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed by an experienced veterinarian.

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.

For novel pathogens like SARS-CoV-2, serology and vaccine dose-response studies are essential for vaccine development. 10.1.c

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 animal procedures are performed

10.2.g

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.

Blood sampling and mucosal swabbing are part of normal veterinary care and will induce only mild discomfort. 10.1.c

Blood sampling in guinea pigs is carried out under anaesthesia.

Vaccination can result in a transient increase in rectal temperature, sometimes accompanied with a reduced level of activity and appetite, and a transient vaccination site reaction. Systemic reactions will generally disappear within 24 hours, but local reactions (that are generally painless) can persist for several days and even weeks. Vaccination with a live attenuated vaccine could induce mild disease symptoms specific for the pathogen used as vaccine, but this is very unlikely.

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked by a certified person once a day or multiple times a day in case clinical symptoms/disease becomes apparent or is expected. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed by a veterinarian.

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

In consultation with the veterinarian and study director it will be decided whether to apply adequate veterinary care to alleviate unexpected pain and/or distress (If treatment does not interfere with the test results). In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP referred to in each study protocol.

Pain relief may be used, if it does not interfere with the test results. A decision to apply adequate veterinary care to alleviate pain and/or distress will be decided in consultation with the veterinarian and study director. Possible options for analgesia: local analgesia, NSAIDs and opioids.

~~Syrian hamsters and rabbits~~ 10.1.c

The number of samplings will be done in accordance with the applicable guidelines or if no requirements are given, the number of samplings is reduced to a minimum number required for a valid evaluation of results.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

None

Explain why these effects may emerge.

10.2.g

Not applicable

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

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.

Piloerection, non-reactivity to stimulants, lack of alertness, abnormal posture (general indication of discomfort)

Indicate the likely incidence.

10.1.c Mortality is lower than 5% (1:20). Chances increase if the procedure is repeated more than 4 times on the same animals. The chance of mortality in an experimental group with 6 animals and 2 samplings is therefore low and integrity of data is warranted.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The following overview shows the maximal discomfort caused by the serology and vaccine dose-response studies.

For procedures described in section A the cumulative discomfort score for the sampling may be moderate due to repeated sampling.

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
Candidate vaccines	Guinea pigs (> 4 weeks)	Moderate (95%), Severe (5%)	Max 1 week Max 1 day
Candidate vaccines	Rabbits (>7 weeks) or	Mild (100%)	Max 1 day
Candidate vaccines	Syrian hamsters (>4 weeks)	Mild (100%)	Max 1 day

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.

Guinea pigs / ~~Syrian hamsters / rabbits~~ will be humanely euthanized at the end of the study. Blood will be collected (serum to be used in in vitro experiments) and post mortem examination will be carried out to determine the safety profile of the vaccine used (if deemed necessary). ~~Spleens will be isolated for B-cell isolation.~~

10.1.c

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.

10.2.g

Yes

10.2.g



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).
- 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'. 10.2.g
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 10.2.g
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|-------------------------------------|
| 2 | Optimization of the challenge model |

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.

To determine the efficacy of a vaccine, vaccinated animals are challenged with the pathogenic organism or disease agent (in this case SARS-CoV-2) to demonstrate that vaccinated animals do not show any clinical signs of disease or at most, mild and transient clinical signs after challenge, and reduced shedding of the virus. For this purpose, challenge models are set up that try to mimic the natural disease as much as possible.

In these procedures, it is useful to include non-infected / non-vaccinated animals (sentinel animals) for confirmation that a pathogenic organism effectively spreads between individuals, **and confirmation that no other pathogen is circulating that interferes with the test.**

In general, application of the pathogen or disease agent will be done via the natural route of infection, but if the natural route does not induce all presentations of a disease under laboratory conditions, it might be necessary to use another route (e.g. parenteral injection to induce a systemic infection).

Parameters to be measured depend on the pathogen or disease agent used, in this case SARS-CoV-2, but will normally include one or more of the following procedures:

- Inoculation of challenge virus
- Monitoring of clinical signs (e.g. changes in general health)
- Measuring of body temperature (rectal temperature or via transponder)
- Determination of pathogen shedding or dissemination (swabbing of mucosal surfaces (nasal swabs/washes), testing of faecal/urinal samples)
- Serological response (amnestic response), viraemia, or haematological changes (blood sampling)
- X-ray analysis (pneumonia), or ultrasound if possible
- Post-mortem examination (pathology in the respiratory tract and other organs)

10.2.g

Necropsy will be performed to determine the presence of gross or histologic lesions and/or take samples to detect the presence of the challenge pathogen or disease agent in internal organs and tissues. The severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen or disease agent. However, the duration of severe suffering will be limited due to the application of a humane endpoint. For SARS-CoV-2, no challenge model is described in a specific Ph.Eur monograph. Therefore, this model will be set

10.1.c

to ensure a suitable challenge model taking efficacy and discomfort into account. 10.1.c

Challenge models will be optimized to enable vaccine development for SARS-CoV-2. The setup of a challenge model for such a novel pathogen requires that the basic characteristics of the pathogen have to be identified, and that experimental confirmation of Koch's postulates has been obtained, which is the case for SARS-CoV-2 (see for example Fuk-Woo Chan et al., 2020). As it is important to have the smallest possible variation in the level of disease/clinical signs between animals to be able to work with the lowest number of animals possible in challenge experiments, improvement/refinement of the challenge model (e.g. change in the route of inoculation, apply a dose-response with regard to challenge dose) will need to be undertaken. Also, when a new challenge inoculum is prepared, suitability for use in challenge studies will have to be evaluated in the model.

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

Two or more of the following procedures will be employed for study of the SARS-CoV-2 in infected/challenged Syrian hamsters, cats and ferrets (in italics the frequency of the procedures):

1. Daily observation / scoring clinical signs (*1x - daily*)
2. Measurement of body temperature (via intra-peritoneal transponder placed prior to the study under sedation, rectal measurement as backup) (*1x- daily*)
3. Weighing (*1 - 5 x*)
4. Blood sampling to determine immunological parameters and/ / or to determine the presence of the challenge strain in the blood (*1 - 10 x*)
5. Challenge administration (intravenous / subcutaneous / intramuscular / intradermal / ocular / intranasal (dropwise or nebulisation) / oral / intratracheally / rectal) (*1 - 2 x*)
6. Swabbing of (mucosal) surfaces (oral/nasal/ocular/rectal/vaginal), nasal washes to determine excretion of the vaccine (up to 14 days) and / or excretion of the challenge strain (up to 28 days) (*1x-daily*)
7. X-ray (*1 - 3x*) or ultrasound if possible
8. Sedation (transponder placement, challenge administration, blood sampling, X-ray (*1- 10x*))
9. Euthanasia and necropsy

The duration of all procedures described above will only be minutes. The length of the observation period after challenge will be 1 day to 4 weeks. To rule out that clinical signs are caused by (co-) infection with another pathogen or disease agent, non-infected control animals (sentinels) will be included in a study.

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

The number of animals used in this type of study will be relatively small (6-8) as they are only intended to get an indication of the ability of a (potential) pathogen or disease agent or live vaccine candidate to induce disease and the variation within an infected group. Knowledge of the variance in an unvaccinated and vaccinated group is needed for sample size calculation for future vaccination-challenge studies.

Current group size is based on the study of Shi et al., 2020 (cat, ferrets). The Syrian hamster model was described by Chan et al., 2020 and is slightly different because sampling of blood means that the animal needs to be sacrificed. In this case the animals will be sacrificed in pairs at different time points after challenge, and no repeated sampling can be applied.

B. The animals

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

Cats (target species, both sexes) and ferrets (target species, males and also females, female use dependent on age at start of experiment and duration) will be used for this type of animal experiment.

10.2.g

Furthermore, Syrian hamsters (females, males if possible) can be used as a **target** species for model optimization or confirmation of challenge batch infectivity in animals, **but for this species it is not intended to obtain a label claim for a licensed vaccine.**

Purchase of animals:

Syrian hamsters, cats (**European shorthair**) and ferrets (**all SPF**) will be purchased from licensed commercial vendors.

Age of animals:

The age of Syrian hamsters is 4 weeks to adult (**about 100 g @ 4 weeks**). The age of cats and ferrets varies from 8 weeks old to adult (**about 850 g @ 8 weeks for cats, 400 g @ 8 weeks ferret**). The age of the cats and ferrets to be used is representative of the age for which the actual vaccine will be developed. Since vaccines are intended of usage in every life stage of the animal the effect of the pathogen or disease agent and/or vaccine on pregnancy needs to be studied, however not for conditional licensing. Therefore, it will **not** be necessary to purchase pregnant animals **in this** stage of the project.

Numbers:

10.1.c

These can be taken as a starting point to develop challenge models for SARS-CoV-2. This will include an infectious dose - response study.

Syrian hamsters:

Maximum of 6 directly challenged and 2 sentinel animals per group (plus 1 untreated per group)

- Route of infection and dose finding: 2 possible routes, 3 challenge doses (→ max 48 hamsters)
- Validation with optimal dose and route (**8 hamsters** per experiment) if new batch of challenge virus is prepared (3 batches, → max 24 hamsters)
- Repetition of an experiment in case of unexpected events during the test that invalidate results (→ max 32 hamsters)
- Untreated hamsters kept for comparison (→ max 13 hamsters)

Total max 117.

Cats:

Maximum of 6 directly challenged and 2 sentinel animals per group (plus 1 untreated per group)

- Route of infection: 2 possible routes, 3 challenge doses (→ max 48 cats)
- Repetition of an experiment in case of unexpected events during the test that invalidate results (→ max 24 cats)
- Untreated cats kept for comparison (→ max 9 cats)

Total max 81.

Ferrets:

Maximum of 6 directly challenged and 2 sentinel animals per group (plus 1 untreated per group)

- Route of infection: 2 possible routes, 3 challenge doses (→ max 48 ferrets)
- Repetition of an experiment in case of unexpected events during the test that invalidate results (→ max 24 ferrets)
- Untreated ferrets kept for comparison (→ max 9 ferrets)

Total max 81.

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.

For research on novel pathogens such as SARS-CoV-2, **cats and ferrets** from previous studies can be re-used if **available and sero-negative** (highly likely)

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

10.2.g

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:

Cats and ferrets must be used for these studies because ultimately these are the species for which the vaccines are tended to induce protection. Therefore, infection models have to be developed in the target animals. ~~Syrian hamsters are also a target species of the virus, but for this species it is not intended to obtain a label claim for a licensed vaccine.~~

Reduction:

The numbers of animals used will be reduced wherever possible without endangering the scientific integrity of the work. This will be achieved through an on-going evaluation of the observations in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. 10.1.c

Refinement:

Cats and ferrets are the animal species that the vaccine is intended to be ultimately applied to, ~~Syrian hamsters can be regarded sentient model species for the cat or ferret disease.~~ Regulations and guidelines determine to a large extent what sort of data must be generated and, to a large extent, this determines what form of models and methods can be employed.

The classic method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, the immune responses measured in the vaccine recipients will be assessed in each orientating efficacy study. If immunological correlates of protection (e.g. a serological response) can be used to prove efficacy this will be used rather than challenge tests in further studies. When a challenge model has to be used, humane end-points will be employed and staff will be fully trained to recognize animals that experience discomfort. Animals will be closely monitored, and extra checks will be made to ensure that no animal is left suffering. The intratracheal route is specifically relevant in the study of respiratory viruses. It will be assessed if nebulization can be used as an alternative for the intratracheal inoculation. After animals have arrived from the suppliers, handling of the animals for sampling procedures specific for the study to be performed is trained by qualified personnel.

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

In general, Syrian hamsters, cats and ferrets are always housed socially. Furthermore, to enhance animal welfare three major criteria are taken into account: 1) social interaction, 2) access to food and 3) the possibility of moving freely. Programs are in place for the housing and caring of animals exposed experimentally to pathogens, with emphasis on management and safety practices for containment (according to the regulations of Biosafety level 1 – 3).

An active approach to providing environmental enrichment will be taken. This will enable animals to express their species-specific behavioural repertoire. Appropriate and multiple objects that allow comfortable resting and play materials will be provided, and new ideas for improving the general wellbeing of the animals encouraged and implemented when and where appropriate.

The procedures being carried out are routine vaccinations, minimally invasive swabbing and the taking of small blood samples. In order to prevent undue stress during blood sampling in ferrets and cats, sedation will be used. Sedation will be carried out using licensed agents and dosing regimens developed under guidance of a veterinarian.

For monitoring of the clinical health status of Syrian hamsters, cats and ferrets, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. The frequency of observation will be increased after challenge in anticipation of possible clinical symptoms of disease. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded.

10.2.g

In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed by a veterinarian.

Infection studies using a challenge model will require that all animals are exposed to SARS-CoV-2. This likely results in clear clinical symptoms in unvaccinated control animals. When it is clear that the clinical picture of the disease agent has been established, the scientific endpoint is reached and subsequently these animals will be euthanized. In some cases, the scientific and the humane endpoint are reached simultaneously at which point these animals will be euthanized. Consequently, the level of severity for the challenge studies will be mild to severe. When it is clear that continuation would not provide any additional scientific data, every effort will be made to euthanise the animal before the humane endpoint is reached. The challenge with virus takes place in DM-III facilities to prevent spread of the virus into the environment.

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.

For novel pathogens like SARS-CoV-2, infection (challenge) model setup is essential for vaccine development. The model will be set up according to information already obtained in experimental infection models for SARS-CoV-2 in Syrian hamsters, cats and ferrets. Until the moment a serological correlate of protection is identified, challenge models have to be used to test vaccine efficacy. Challenge models will be improved and refined on the basis of the current scientific literature **10.1.c**

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 animal 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.

10.2.g

Blood sampling, administration of a transponder, nasal washes and mucosal swabbing are part of normal veterinary care and will induce only mild discomfort. 10.1.c

The administration of the infection/challenge inoculum will only induce short term mild to moderate discomfort but depending on the nature of the subsequent infection the discomfort of the challenge can range from moderate to severe.

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked by a certified person once a day or multiple times a day in case clinical symptoms/disease becomes apparent or is expected. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed by an experienced veterinarian.

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

In consultation with the veterinarian and study director it will be decided whether to apply adequate veterinary care to alleviate unexpected pain and/or distress (If treatment does not interfere with the test results). In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in a SOP and test specific humane endpoints are given in each study protocol. In case of blood sampling (ferret, cat) or challenge via the intratracheal route (all species), animals will first be sedated to minimize discomfort.

X-ray analysis will be conducted after sedation as indicated above.

These procedures are part of the study design to monitor the course of the infection model and the health and welfare of the animals or to facilitate smooth administration of challenge material (intratracheal).

The number of samplings will be done in accordance with the applicable guidelines or if no requirements are given, the number of samplings is reduced to a minimum number required to for a valid evaluation of results.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

No adverse effects are to be expected

Explain why these effects may emerge.

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

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.

To determine the efficacy of a vaccine it is necessary to challenge animals with SARS-CoV-2. Symptoms to be expected are mild respiratory symptoms such as difficulty breathing, sneezing, ocular discharge, but possibly also vomiting and diarrhea. Such symptoms typically last for 4-5 days. Fever seems mild if detected at all. The duration of discomfort will be limited due to the application of a test- and pathogen specific humane endpoint described in the corresponding study protocol. These contain information about the clinical signs that can be expected and describe when a humane endpoint has been reached for (a combination of) the respective clinical signs. It also describes the scientific endpoint; The humane endpoints are always leading. **The specific humane endpoints are severe weight loss and / or respiratory distress.**

10.2.g

In addition, general humane endpoints (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight, pain) are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

The description and improvement of specific humane endpoints is an ongoing process **10.1.c**. An active approach will be taken to improve and adjust humane endpoints based on experience during the studies.

Indicate the likely incidence.

Considering the expected number of studies with SARS-CoV-2, the expected number of animals included in the different treatment groups (i.e. experimentally infected, sentinel vs control group) and the expected severity, a maximum of 10% of the animals is expected to have severe discomfort that would require euthanasia. In the published ferret model (Richard et al., 2020), all inoculated and the majority of sentinel ferrets acquired the infection and showed no or mild symptoms as described above. The cat model of Shi et al., 2020 showed similar results for cats. The Syrian hamster model of Fuk-Woo Chan et al. (2020) showed moderate symptoms in inoculated animals, including respiratory symptoms and weight loss, from which the animals recovered. We keep 10% severe discomfort in this Appendix as a safety precaution because current literature is too sparse to be able to exclude severe discomfort, but it underlines that the expected percentage is low.

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').

Similar to natural field infections they may cause mild to sometimes severe pain, distress or suffering. There are not sufficient studies published at the moment to get a full picture of clinical symptoms, which may for example depend on route of challenge and challenge dose. We estimate that a large subset of animals, primarily sentinels, undergo mild infections with hardly any clinical symptoms, and that the other subset of the animals experiences moderate discomfort due to clinical symptoms including an upper respiratory tract infection. Only very few animals will show severe symptoms. In Syrian hamsters, it is likely that more inoculated animals show moderate symptoms

The following overview shows the maximal discomfort caused by the **procedures and** disease and the maximum number of animals expected to reach the highest discomfort category over the next 5 years: **Due to procedures described in section A the cumulative discomfort score for the sampling in cats and ferrets is moderate due to repeated sedation. As explained, there is no repeated sampling in Syrian hamsters.**

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
SARS-CoV-2	Syrian hamster >4 weeks old	Mild (39/117= 33%) Moderate (65/117= 56%) Severe (13/117= 11%)	Max 1 week Max 1 week Max 1 day
SARS-CoV-2	Cats >8 weeks old	Mild (52/117= 44.5%) Moderate (72/81= 89%) Severe (9/81= 11%)	Max 1 week Max 1 week Max 1 day
SARS-CoV-2	Ferrets >8 weeks old	Mild (52/117= 44.5%) Moderate (72/81= 89%) Severe (9/81= 11%)	Max 1 week Max 1 week Max 1 day

It is to be expected that a number of cats can be sampled without sedation, for these cats final discomfort scores may be reduced to mild.

End of experiment

L. Method of killing

10.2.g

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.

Animals will be humanely euthanized at the end of a study. Necropsy is required at the end of the study for scientific reasons, and no animals may be released from a BSLIII facility (biosafety regulations).

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

10.2.g



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).
- 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'.

10.2.g

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
3	Efficacy studies in cats, ferrets and Syrian hamsters

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The aim of the work to be carried out under this Appendix is to test efficacy of a cat/ferret vaccine that should prevent clinical symptoms of the COVID-19 disease caused by the SARS-CoV-2 in these species, and a significant reduction in virus shedding. This Appendix builds on the challenge model established in Appendix 2.

The efficacy of the vaccine is tested based on clinical parameters or relevant legislation, such as general Ph.Eur guidelines (pathogen-specific monograph not available for this emerging pathogen). Clinical parameters as read-out may be replaced by a serological marker if a correlation is established.

Cats/ferrets that have received the recommended vaccination schedule and unvaccinated control animals will be challenged after a specific interval. A label claim can only be obtained for those aspects of a disease that are measured in the respective challenge model and for which a statistically significant difference between vaccinates and controls are shown. In general, efficacy of a vaccine has to be demonstrated for each of the vaccination routes and schedules and for each category of target animal (e.g. age, biological status) to substantiate the claims made for the product in the registration dossier. When testing compatibility of vaccines (by either mixing of vaccines or concurrent separate administration), EU guidelines dictate that in principle for all efficacy claims made for the products protection should be proven by challenge for all components, unless an immunological correlate for protection has been established.

The types of studies in the target animal that in general need to be undertaken are the following:

1. A vaccine dose-response study followed by SARS-CoV-2 challenge (vaccination-challenge) to test efficacy of the vaccine. In general, application of the antigen will be done via the intramuscular route or

10.2.g

subcutaneous route, but it might necessary to use another route (e.g. nasal, mucosal). Parameters to be measured are serological response, determine necessity of booster vaccinations, but this type of experiments can simultaneously be used to confirm safety of the SARS-CoV-2 vaccine candidate chosen. The challenge model described in Appendix 2 will be applied to test efficacy.

2. Determination of the minimum interval between completion of basic vaccination and challenge after which protection can be observed (Onset of immunity study, critical study according to Ph.Eur. 0062, 5.2.7)

3. Determination of the maximum interval between completion of basic vaccination and challenge after which protection can be observed (Duration of immunity study)

4. Determination of the effect of maternally-derived antibody status on the level of protection (MDA study; this study may include vaccination of the pregnant female; **only in scope for obtaining a full license, animals to be requested later if study is required**)

5. Determination of the effect of a single (yearly, two-yearly or three-yearly) re-vaccination, using the desired interval after the basic vaccination(s). (**only in scope for Full license**)

6. In case of more than one vaccination in the basic vaccination schedule: determination of the minimum and maximum interval between the vaccinations (**only in scope for Full licence**)

When challenge (administration of disease agent, i.e. SARS-CoV-2) is required, one or more of the following parameters will be evaluated:

- Monitoring of clinical signs (e.g. changes in general health)
- Measuring of body temperature
- Determination of pathogen shedding or dissemination (swabbing of mucosal surfaces, nasal washes, testing of faecal/urinal samples)
- Serological response (amnestic response), viraemia, or haematological changes (blood sampling)
- X-ray analysis (pneumonia) (or ultrasound)
- Post-mortem examination (pathology in the respiratory tract and other organs)

If an immunological correlate has been established, the evaluation of the immune response (antibody levels) will suffice (blood sampling) and no challenge will be needed.

From a regulatory standpoint, animals must be monitored for differing lengths of time following challenge. In a successful challenge study, control animals generally develop disease well within the stated time period. Virus spread to sentinel animals that are placed in the group after experimental challenge may be part of the model.

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

Depending on the study to be performed, two or more of the following treatments for study of the SARS-CoV-2 in cats, **ferrets and Syrian hamsters** will be employed (in italics the frequency of the treatments) and will be applied in accordance with 'Handboek proefdierkunde' (van Zutphen et al., 2016).

1. Daily observation / scoring clinical signs (*1x - daily*)
2. Application of the antigen, booster(s) (intramuscular, subcutaneous, oral, nasal, intravenous, ocular, intra-peritoneal (*1 - 5 x*))
3. *Measurement of body temperature (via intra-peritoneal transponder placed prior to the study under sedation, rectal measurement as backup) (1x- daily)*
4. Weighing (*1 - 5 x*)
5. Blood sampling to determine immunological parameters and/ / or to determine the presence of the challenge strain in the blood (*1 - 15 x*)
6. Challenge administration (intravenous / subcutaneous / intramuscular / intradermal / ocular / intranasal (dropwise or nebulisation) / oral / intratracheally / rectal) (*1 - 2 x*)
7. Swabbing of (mucosal) surfaces (oral/nasal/ocular/rectal/vaginal), nasal washes to determine excretion of the vaccine (up to 14 days) and / or excretion of the challenge strain (up to 28 days) (*1x-daily*)
8. X-ray (*1 - 3x*) or ultrasound if possible
9. Sedation (transponder placement, challenge administration, blood sampling, X-ray (*1- 10x*))

10. Euthanasia and necropsy

The duration of all procedures described above are expected to be carried out within a matter of minutes. The dose-response study length is 9 weeks, followed by a challenge study. The length of the observation period after challenge depends on the incubation period of the pathogen, for SARS-CoV-2 (short incubation time of days) it is estimated at approximately 4-5 weeks. To rule out that clinical signs are caused by (co-)infection with another disease agent, or to monitor for shed and spread post infection, non-infected control 'sentinel' animals will be included in a study.

A sentinel animal is a non-vaccinated, non-challenged animal that will be placed with the vaccinated/challenged animals on day 1 or day 2 after challenge. The purpose of this procedure is to check spread of the virus from challenged animals to sensitive recipients, **also to make sure that no other circulating pathogen is interfering with results**. In contrast, a control animal is a non-vaccinated animal that is experimentally challenged. Sentinel animals undergo no treatment but are sampled along with the other animals in the study. **Vaccination should limit spread of the virus and thus inclusion of sentinel animals is relevant in the animal model.**

The **efficacy studies can also be conducted in Syrian hamsters, for which the setup of a challenge model for this less sentient species** is described in Appendix 2. Experimental challenge of vaccinated Syrian hamsters **is described in this Appendix. Hamsters are a target species for the virus but it is not intended to obtain a licensed vaccine for the hamsters, so no registration studies are planned for this species.**

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

When animal numbers are not specified in a Ph.Eur. monograph, such as is the case for SARS-CoV-2, the minimum number of animals required to give a sufficient likelihood of a statistically significant result will be used. In this way it can be demonstrated that the test vaccine is efficacious in comparison with the control group. In particular, the variance in the groups together with the magnitude of effect will be used in power calculations to achieve 80% power at the 95% confidence level (regarded by regulatory authorities as the standard by which such experiments should be designed). For respiratory viruses in general, group sizes of 10-15 animals are typically required to reach statistical significance.

For Syrian hamsters, group sizes **in Appendix 1** are set at 6. Challenge experiments are conducted with 6 vaccinated animals, 2 sentinels and negative control group. **We would like to include this option to confirm that a vaccine candidate is indeed protective, prior to starting registration studies in target animals (cats, ferrets, with much larger group size).**

B. The animals

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

Cats of both sexes will be used for this type of animal experiment. Ferrets of both sexes (**female use dependent on age at start of experiment and duration**) will be used for this type of animal experiment.

Sourcing of animals:

Cats (**European short hair**) and ferrets (**both SPF**) will be purchased from licensed commercial vendors.

Numbers:

Numbers are based on the set of experiments to be completed for registration. We base the numbers on the following studies to be completed:

- Dose-finding (2 vaccine candidates)
- Efficacy for conditional licensing (2 vaccine candidates)
- Onset of immunity at 2, 3, 4 weeks after vaccination (1 vaccine candidate, full license)
- Duration of immunity 6-12 months (1 vaccine candidate, full license)
- Repetition of an experiment plus control group in case of unexpected events during the test that invalidate results