

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

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

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

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

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

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

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

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

Er zijn voornamelijk geen andere symptomen te verwachten.

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

Gezien eerdere publicaties van soortgelijke experimenten met SARS-CoV (Roberts, 2007, PLoS Path) is aannemelijk dat afhankelijk van de dosering >20% gewichtsverlies binnen 3-5 dagen kan optreden vanaf het moment dat een virus pathogeen wordt voor muizen. In deze studies dan ook waarschijnlijk dat in latere passages alle geïnfecteerde muizen een humaan eindpunt bereiken.

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

K. Classificatie van ongerief

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

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

door verhoogde observatiefrequentie wanneer dit noodzakelijk wordt geacht. Het maximale cumulatief ongerief wordt daarom ingeschaald als 'ernstig'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 3 | Module 3: Time-course coronavirusinfecties |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

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

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

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

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

In het geval het om time-course bepalingen gaat van MERS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis (Pascal, 2015, PNAS), konijn **10.2.e** en immuun gecompromitteerd (IC) konijn.

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

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

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

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

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

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

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

Dag 0-x: dagelijks wegen

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

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

NB: in het geval van het gebruik van immuun gecompromitteerde konijnen zullen de dieren voorafgaand aan de infectie en dagelijks na infectie tot de laatste dag van follow up tweemaal-daags behandeld worden met prednisolon via de intramusculaire route (toediening zal plaatsvinden zonder gebruik van anesthesie).

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

Per eindpunt/euthanasiemoment zullen voor de diermodellen dieren geïnfecteerd worden.

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

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

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

Module 3	Diersoort	Groeps-grootte	Geschat aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar	licht	matig	ernstig
TC	Muis	10.1.c	4	2	10.1.c			10.1.c
	Muis transgeen			4				
	Fret			3				
	Kat			3				
	Hamster			3				
	IC Konijn			3				
	Konijn			3				

B. De dieren

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

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

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

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

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

Zoals eerder beschreven kunnen immuun gecompromitteerde konijnen gebruikt worden om het behandelingseffect op ziekte (module 6) te bestuderen. In dit geval zullen de dieren dagelijks met prednisolon (2 mg/kg/dag) worden behandeld om het (innate) immuunsysteem te verzwakken. Als dit model in een pilot experiment (module 1) leidt tot (versterkte) klinische verschijnselen kan het model voor deze module worden gebruikt. Als in immuun gecompromitteerde konijnen geen klinische verschijnselen na een infectie met MERS-CoV worden geobserveerd zal alsnog het hier beschreven konijnen model (met een intacte immuun systeem) voor het testen van antivirale interventiestrategieën worden gebruikt zoals beschreven in het oorspronkelijke projectvoorstel.

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

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

Muizen (≥ 5 wk: Roberts, 2005, JVI; Pascal, 2015, PNAS; Tseng, 2007, JVI), fretten (≥ 3 mnd: 10.2.e

, katten (≥ 8 wk: 10.2.e

, hamsters (≥ 5 wk, Roberts, 2005, JVI), konijnen (≥ 6 mnd: 10.2.e

Bij muizen kan gebruik gemaakt worden van transgene dieren die ofwel de receptor voor SARS-CoV (ACE2: Tseng, 2007, JVI), ofwel de receptor voor MERS-CoV (huDPP4: Pascal, 2015, PNAS) tot expressie brengen.

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

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

- Hamster – vrouw (model, Roberts, 2005, JVI)
- Muis, wild type coronavirussen
 - Balb/c – vrouw (Subbarao, Roberts)
 - Tg – geen specificatie (Pascal, 2015, PNAS; Tseng 2007)
- Muis, aangepaste coronavirussen
 - Balb/c – vrouw (Day 2009, Roberts 2007)
- Konijn – vrouw (10.2.e)
- Fret, man/vrouw – 10.2.e
- Kat, vrouw – 10.2.e

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

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

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

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

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

Muis: 10.1.3

Muis (transgeen): 10.1.3

Fret: 10.1.3

Kat: 10.1.3

Hamster: 10.1.3

Konijn: 10.1.3

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

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

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

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

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

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

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Afhankelijk van de virulentie van de gebruikte virusstam en de proefdiersoort kan er in meer dan wel mindere mate sprake zijn van klinische symptomen als gevolg van de coronavirusinfectie. De klinische symptomen die voor de preklinische modellen die in dit projectvoorstel gebruikt worden zijn met name respiratoir van aard: deze kenmerken zich door een verhoogde ademhalingsfrequentie tot moeizaam ademen waarbij de flanken zichtbaar overdreven ingetrokken worden, de dieren gestrekt gaan liggen (teneinde de luchtwegen zoveel mogelijk toegankelijk te houden) en lethargisch zijn en/of een stokkende ademhaling (dyspneu). Zie ook humane eindpunten bij sectie J. In de IC konijnen zou door het twee maal daags intramusculaire toedienen van prednisolon verhoogd ongerief (pijnlijke prikplek) kunnen ontstaan. Daarnaast is het doel van prednisolon inspuiting om bij de konijnen klinische verschijnselen van de coronavirusinfectie te induceren. De ongerief verhoging is maximaal matig vanwege de inspuiting met Prednisolon en ernstig ingeval klinische verschijnselen optreden als gevolg van de coronavirusinfectie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De coronavirusinfectie. Tweemaal daags intramusculaire toediening van prednisolon voor IC konijnen.

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

Tweemaal daags observatie van de dieren vanaf infectie. De observatiefrequentie zal verhoogd worden indien nodig, mochten observaties daartoe aanleiding geven. Er zijn humane eindpunten gedefinieerd, zie J. Zoveel als mogelijk zal er geprobeerd worden om de prikplek te variëren en zo het ontstaan van hematomen bij IC konijnen te voorkomen.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

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

combinatie wordt ingeschaald als ernstig ongerief) of een stokkende ademhaling (dyspneu) (beide zijn humane eindpunten).

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

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

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

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

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

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

Gepubliceerde coronavirusinfecties in katten, hamsters en konijnen verlopen zonder klinische verschijnselen. In fretten is bij SARS-CoV infecties in 50% van de dieren lethargie gerapporteerd (10.2.e). In jonge inteeltmuizen verloopt de SARS-CoV infectie eveneens asymptomatisch. In oude (12 mnd) Balb/c muizen zijn klinische verschijnselen als opstaande haren, gewichtsverlies (< 10%) en lichte dehydratie gerapporteerd (Roberts, 2005, JVI). In huDPP4 knock-in muizen die voor MERS-CoV infecties gebruikt worden verloopt de infectie zonder manifestatie van klinische verschijnselen (Pascal, 2015, PNAS). Samenvattend lijkt de kans op het bereiken van de humane eindpunten in deze modellen zeer klein (<5%). In ACE2 transgene muizen geïnfecteerd met SARS-CoV zijn klinische verschijnselen als >20% gewichtsverlies en mortaliteit gerapporteerd (Tseng, 2007, JVI), afhankelijk van de infectiedosis. Ook in het geval dat aan de muis geadapteerde virusstammen afkomstig uit Module 2 gebruikt worden is het gezien eerdere publicaties van soortgelijke experimenten met SARS-CoV aannemelijk dat afhankelijk van de dosering >20% gewichtsverlies binnen 3-5 dagen kan optreden. Om de eindpunten van infectie te kunnen bepalen zal voor deze modellen een infectiedosis gekozen worden op basis van de resultaten in Module 1 die garandeert dat de eindpunten bepaald kunnen worden.

De kans op het optreden van de algemene humane eindpunten (4 en 5) wordt zeer klein geacht, $\leq 1\%$. Immuun gecompromitteerde konijnen kunnen na infectie met MERS-CoV verhoogd last van ademhalingsproblemen vertonen. Daarom is ook de kans op het bereiken van de humane eindpunten hoger. Het is echter onbekend of immuun gecompromitteerde konijnen klinische verschijnselen na infectie met MERS-CoV zullen vertonen en wat het daarmee geassocieerde ongerief zal zijn. In een pilot experiment (module 1) zal daarom aandacht worden besteed aan de observatie van de dieren, het optreden van klinische verschijnselen en het bereiken van de humane eindpunten.

K. Classificatie van ongerief

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

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

De beschreven HEP's voor modellen met klinische verschijnselen verminderen het optreden van ernstig ongerief, maar 100% garantie op het voorkomen ervan is niet af te geven. Kortdurend ernstig ongerief in

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

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 4 | Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De experimenten in dit deel van het projectvoorstel zijn opgezet om de farmacokinetiek van antivirale formuleringen/preparaten te bepalen. De resultaten van deze experimenten kunnen gebruikt worden om de opzet voor studies naar de werkzaamheid van deze preparaten te maken die in Module 6 beschreven wordt, waarin de effectiviteit van behandelingsmethoden tegen coronavirusinfecties wordt bepaald. De opgevoerde modellen (muis, hamster, fret, konijn, IC konijn, kat) zullen gebruikt worden in de volgende gevallen, dit keuzeproces is verduidelijkt in de flowchart (zie Appendix 1), in het bovenste deel:

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

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

In het geval het om farmacokinetiek studies gaat van antivirale middelen/preparaten tegen MERS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis (Pascal, 2015, PNAS), konijn (10.2.e) en immuun gecompromitteerd (IC) konijn.

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

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

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

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

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

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

Dag 0 – 14: bloedafnames onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig, de frequentie hiervan is afhankelijk van het uit te testen preparaat (maximaal 2 x daags, tevens afhankelijk van het diersmodel). Afhankelijk van het preparaat en de beschikbare informatie kunnen extra toedieningsmomenten in deze periode nodig zijn (maximaal 3 x daags, tevens afhankelijk van het diersmodel), bv. wanneer er aanwijzingen zijn dat de halfwaardetijd van het preparaat in het dier onder een bepaalde tijd ligt waardoor extra toedieningsmomenten vereist zijn om een minimaal vereiste concentratie te kunnen garanderen. Toedienings-, afnamevolumes en frequentie zullen volgens richtlijnen beschreven in Diehl et al. (J Appl Toxicol, 2001) plaatsvinden.

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

NB: in het geval van het gebruik van immuun gecompromitteerde konijnen zullen de dieren voorafgaand aan de toediening van het antivirale preparaat en dagelijks na toediening tot de laatste dag van follow up tweemaal-daags behandeld worden met prednisolon via de intramusculaire route (toediening zal plaatsvinden zonder gebruik van anesthesie).

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

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

Voor studies ter bepaling van de farmacokinetiek van antivirale middelen worden maximaal 4 groepen per studie gebruikt: aan de hand van beschikbare gegevens van het preparaat of vergelijkbare preparaten in soortgelijke modellen zullen een aantal doseringsschema's opgesteld worden. De doseringsschema's van de verschillende groepen kunnen bestaan uit meerdere toedieningsmomenten in verschillende tijdsintervallen, verschillende concentraties van het uit te testen preparaat of een combinatie daarvan.

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

Module 4	Diersoort	Groeps-grootte	Geschat aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar			
						licht	matig	ernstig
PK	Muis	10.1.c	4	3	10.1.c		10.1.c	
	Muis transgeen			7				
	Fret			5				
	Kat			5				
	Hamster			5				
	IC Konijn			5				
	Konijn			5				

B. De dieren

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

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

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

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

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

Zoals eerder beschreven kunnen immuun gecompromitteerde konijnen gebruikt worden om het behandelingseffect op ziekte (module 6) te bestuderen. In dit geval zullen de dieren dagelijks met prednisolon (2 mg/kg/dag) worden behandeld om het (innate) immuunsysteem te verzwakken. Als dit model in een pilot experiment (module 1) leidt tot (versterkte) klinische verschijnselen kan het model voor deze module worden gebruikt. Als in immuun gecompromitteerde konijnen geen klinische verschijnselen na een infectie met MERS-CoV worden geobserveerd zal alsnog het hier beschreven konijnen model (met een intacte immuun systeem) voor het testen van antivirale interventiestrategieën worden gebruikt zoals beschreven in het oorspronkelijke projectvoorstel.

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

Soort en levensstadia: afhankelijk van het gekozen coronavirus zal het meest relevante diemodel gekozen worden, waarbij vatbaarheid voor het gekozen coronavirus een belangrijke rol speelt. In huis gegenereerde en misschien niet publiekelijke resultaten, maar ook wetenschappelijke publicaties vormen de basis voor

deze keuze. De verschillende leeftijden voor de verschillende modellen zijn hieronder weergegeven op basis van wetenschappelijke publicaties, maar kunnen bijgesteld worden indien additionele data beschikbaar zijn. Indien het laatste het geval is zullen deze data voorgelegd worden aan de IvD ter beoordeling.

Muizen (≥ 5 wk: Roberts, 2005, JVI; Pascal, 2015, PNAS; Tseng, 2007, JVI), fretten (≥ 3 mnd: 10.2.e [redacted]), katten (≥ 8 wk: 10.2.e [redacted]), hamsters (≥ 5 wk, Roberts, 2005, JVI), konijnen (≥ 6 mnd: 10.2.e [redacted])

Bij muizen kan gebruik gemaakt worden van transgene dieren die ofwel de receptor voor SARS-CoV (ACE2: Tseng, 2007, JVI), ofwel de receptor voor MERS-CoV (huDPP4: Pascal, 2015, PNAS) tot expressie brengen.

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

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

- Hamster – vrouw (model, Roberts, 2005, JVI)
- Muis, wild type coronavirussen
 - Balb/c – vrouw (Subbarao, Roberts)
 - Tg – geen specificatie (Pascal, 2015, PNAS; Tseng 2007)
- Muis, aangepaste coronavirussen
 - Balb/c – vrouw (Day 2009, Roberts 2007)
- Konijn – vrouw 10.2.e [redacted]
- Fret, man/vrouw – 10.2.e [redacted]
- Kat, vrouw – (10.2.e [redacted])

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

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

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

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

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

Muis: 10.1.c [redacted]

Muis (transgeen): 10.1.c [redacted]

Fret: 10.1.c [redacted]

Kat: 10.1.c [redacted]

Hamster: 10.1.c [redacted]

Konijn: 10.1.c [redacted]

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

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

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

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

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

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

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

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In de IC konijnen zou door het twee maal daags toedienen van prednisolon verhoogd ongerief (pijnlijke prikplek) kunnen ontstaan.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Tweemaal daags intramusculaire toediening van prednisolon voor IC konijnen.

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

Zoveel als mogelijk zal er geprobeerd worden om de prikplek te variëren en zo het ontstaan van hematomen bij IC konijnen te voorkomen.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Humane eindpunten die zich sporadisch kunnen voordoen in dierstudies in het algemeen zijn:
1. Het dier vertoont onbehandelbare wonden door bv. vechten of op andere wijze opgelopen.

2. Het dier vertoont een matig-ernstig afwijkend gedrags- en voortbewegingspatroon.

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

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

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

K. Classificatie van ongerief

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

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

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De dieren zullen worden geëuthanaseerd om bloed en eventueel organen te verzamelen voor analyse.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 5 | Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De experimenten in dit deel van het projectvoorstel zijn opgezet om de immunogeniciteit van coronavirus-specifieke vaccinpreparaten te bepalen. Hiertoe worden de dieren volgens verschillende schema's geïmmuniseerd met de (kandidaat) vaccinpreparaten waarna de immuunrespons op gezette tijden ná immunisatie bepaald wordt aan de hand van geïnduceerde effectoren in het serum. De resultaten van deze experimenten zullen gebruikt worden om de vaccinatieschema's op te zetten waarmee de werkzaamheid van de vaccinpreparaten bepaald kan worden in de studies beschreven in Module 6.

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

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

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

In het geval het om immunogeniciteitsstudies gaat van vaccinpreparaten tegen MERS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis (Pascal, 2015, PNAS), konijn **10.2.e** en immuun gecompromitteerd (IC) konijn.

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

geschikte model geselecteerd worden, op basis van aantoonbare virusreproductie in het betreffende model na infectie met deze nieuwe coronavirusvarianten.

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

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

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

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

In het geval van een schema met meerdere vaccinaties zal de toediening van de vaccinpreparaten herhaald worden. Intervallen tussen vaccinaties kunnen variëren van dagen tot weken, afhankelijk van het uit te testen vaccinpreparaat. Om de opgewekte immuunresponsen te kunnen bepalen zullen na iedere vaccinatie bloedmonsters genomen worden onder voor de diersoort en behandeling adequate sedatie indien nodig. De frequentie en timing hiervan kan variëren, afhankelijk van het uit te testen vaccinpreparaat. De maximale afnamefrequentie zal eens per week zijn. De looptijd van een immunogeniciteitsstudie kan variëren van weken tot maanden. Gedetailleerde toedienings- en afnameschema's zullen aangeleverd worden aan de IvD in de daarvoor opgestelde werkprotocollen. Toedienings-, afnamevolumes en frequentie zullen volgens richtlijnen beschreven in Diehl et al. (J Appl Toxicol, 2001) plaatsvinden.

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

NB: in het geval van het gebruik van immuun gecompromitteerde konijnen zullen de dieren voorafgaand aan de vaccinatie en dagelijks na vaccinatie tot de laatste dag van follow up tweemaal-daags behandeld worden met prednisolon via de intramusculaire route (toediening zal plaatsvinden zonder gebruik van anesthesie).

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

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

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

Voor studies ter bepaling van de immunogeniciteit van vaccins worden maximaal 6 groepen per studie gebruikt: aan de hand van beschikbare gegevens van het vaccin of vergelijkbare vaccins in soortgelijke modellen zullen een aantal doseringsschema's opgesteld worden. De doseringsschema's van de verschillende groepen kunnen bestaan uit meerdere toedieningsmomenten in verschillende tijdsintervallen, verschillende concentraties van het uit te testen vaccin, of een combinatie daarvan waarbij ook sprake kan zijn van combinaties van vaccinpreparaten.

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

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

Module 5	Diersoort	Groeps-grootte	Geschat aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar			
						licht	matig	ernstig
IMM	Muis	10.1.c	6	3	10.1.c			
	Muis transgeen			7				
	Fret			5				
	Kat			5				
	Hamster			5				
	IC Konijn			5				
	Konijn			5				

B. De dieren

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

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

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

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

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

Zoals eerder beschreven kunnen immuun gecompromitteerde konijnen gebruikt worden om het behandelingseffect op ziekte (module 6) te bestuderen. In dit geval zullen de dieren dagelijks met prednisolon (2 mg/kg/dag) worden behandeld om het (innate) immuunsysteem te verzwakken. Als dit model in een pilot experiment (module 1) leidt tot (versterkte) klinische verschijnselen kan het model voor deze module worden gebruikt. Als in immuun gecompromitteerde konijnen geen klinische verschijnselen na een infectie met MERS-CoV worden geobserveerd zal alsnog het hier beschreven konijnen model (met een intacte immuun systeem) voor het testen van antivirale interventiestrategieën worden gebruikt zoals beschreven in het oorspronkelijke projectvoorstel.

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

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

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

Muizen (≥ 5 wk: Roberts, 2005, JVI; Pascal, 2015, PNAS; Tseng, 2007, JVI); fretten (≥ 3 mnd: 10.2.e

, katten (≥ 8 wk: 10.2.e), hamsters (≥ 5 wk, Roberts, 2005, JVI), konijnen (≥ 6 mnd: 10.2.e

Bij muizen kan gebruik gemaakt worden van transgene dieren die ofwel de receptor voor SARS-CoV (ACE2: Tseng, 2007, JVI), ofwel de receptor voor MERS-CoV (huDPP4: Pascal, 2015, PNAS) tot expressie brengen.

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

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

- Hamster – vrouw (model, Roberts, 2005, JVI)
- Muis, wild type coronavirussen
 - Balb/c – vrouw (Subbarao, Roberts)
 - Tg – geen specificatie (Pascal, 2015, PNAS; Tseng 2007)
- Muis, aangepaste coronavirussen
 - Balb/c – vrouw (Day 2009, Roberts 2007)
- Konijn – vrouw 10.2.e
- Fret, man/vrouw – 10.2.e
- Kat, vrouw –

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

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

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

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

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

Muis (wildtype): 10.1.g

Muis (transgeen): 10.1.g

Fret: 10.1.g

Kat: 10.1.g

Hamster: 10.1.g

Konijn: 10.1.g

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

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

Vermindering: Indien uit studies uit te voeren in het huidige project blijkt dat, bv. door beperkte spreiding in de uitkomsten, met minder dieren evengoed robuuste resultaten te behalen zijn zal dit voortschrijdende inzicht gebruikt worden voor het opstellen van werkprotocollen voor dit project waarin deze vermindering concreet gemaakt wordt. De resultaten verkregen in de studies in deze Module vormen de basis voor een go/no-go moment: indien de immunogeniciteit van de gebruikte preparaten onvoldoende is zal op basis van deze studies geen werkzaamheidsstudie plaatsvinden.

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

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

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

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

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In de IC konijnen zou door het twee maal daags intramusculaire toedienen van prednisolon verhoogd ongerief (pijnlijke prikplek) kunnen ontstaan. Van de immunogenen zelf zijn geen bijwerkingen te verwachten, de eventueel te gebruiken adjuvantia zijn reeds vrijgegeven voor gebruik in humane toepassingen. Nadelige effecten t.g.v. de toediening van de vaccins zijn dan ook niet te verwachten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Tweemaal daags intramusculaire toediening van prednisolon voor IC konijnen.

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

Zoveel als mogelijk zal er geprobeerd worden om de prikplek te variëren en zo het ontstaan van hematomen bij IC konijnen te voorkomen.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

Voor immunogeniciteitsstudies zijn geen andere HEP's van toepassing. Toediening van vaccins/preparaten leidt niet tot situaties waarbij specifieke HEP's optreden, dit is in geen enkele dierstudie van de aanvrager in het verleden geobserveerd. Desalniettemin zal vooraf bij opdrachtgever(s)/leveranciers van de uit te testen

preparaten informatie opgevraagd worden of er bijwerkingen te verwachten zijn, indien nodig worden specifieke HEP's opgenomen in de werkprotocollen voor overleg met de IvD.

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

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

K. Classificatie van ongerief

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

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

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 6 | Module 6: Werkzaamheid antivirale interventiestrategieën |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

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

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

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

In het geval het om werkzaamheidsstudies gaat van antivirale interventiestrategieën tegen MERS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis (Pascal, 2015, PNAS), konijn **10.2 e** en immuun gecompromitteerd (IC) konijn.

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

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

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

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

Bepalen van de werkzaamheid van een therapeutisch preparaat:

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

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

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

Bepaling van de werkzaamheid van een profylactisch preparaat of vaccin:

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

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

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

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

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

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

NB: in het geval van het gebruik van immuun gecompromitteerde konijnen zullen de dieren voorafgaand aan de infectie en dagelijks na infectie tot de laatste dag van follow up tweemaal-daags behandeld worden met prednisolon via de intramusculaire route (toediening zal plaatsvinden zonder gebruik van anesthesie).

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

Op basis van eerder verkregen data (niet gepubliceerd) met MERS-CoV en het vergelijkbare SARS-CoV is gebleken dat groepen van 10^3 dieren noodzakelijk zijn om statistisch significante data te verkrijgen. Een poweranalyse ($\alpha = 0.05$ en power van 80) is uitgevoerd uitgaande van minimaal een $1 \log_{10}$ verandering van de virale load bij een berekende standaard deviatie van maximaal 0.6. Hierbij komen we uit op een aantal van $10^{3.7}$ dieren per groep.

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

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

NOTE: het aantal dieren in onderstaande tabel is aangepast naar aanleiding van de huidige coronavirus uitbraak met 2019-nCoV. Voor de huidige uitbraak van 2019-nCoV zal voornamelijk gekeken worden naar het gebruik van muizen (al dan niet transgeen), konijnen en fretten aangezien eerste analyse van het genoom van 2019-nCoV grote overeenkomsten vertoont met SARS-CoV, maar ook MERS-CoV. Het is de verwachting dat tot aan het einde van de looptijd van deze vergunning (14 maart 2021) we voor elk van de modellen 20 studies uit zullen voeren met een geschat aantal groepen van 10^3 (konijnen en fretten) of $10^{1.6}$ (muizen) per studie met een groeps-grootte van $10^{1.9}$ konijnen en fretten) of $10^{1.6}$ (muizen) dieren. Aantal groepen en groeps-grootte is een schatting en is afhankelijk van het aantal variabelen binnen 1 studie (aantal groepen) en de eventuele spreiding (aantal dieren per groep). Echter, het is onze inschatting dat met de hieronder genoemde hoeveelheden voldoende dieren op de vergunning zullen zijn om te kunnen voldoen aan de vraag voor werkzaamheidsstudies tegen 2019-nCoV.

Module 6	Diersoort	Groeps-grootte	Geschat aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar	licht	matig	ernstig
EFF	Muis	10.1.c	10	10	10.1.c			
	Muis transgeen		10	10				
	Fret		5	20				
	Kat		4	2				
	Hamster		4	2				
	IC Konijn		5	5				
	Konijn		5	15				

B. De dieren

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

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

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

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

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

Zoals eerder beschreven kunnen immuun gecompromitteerde konijnen gebruikt worden om het behandelingseffect op ziekte (module 6) te bestuderen. In dit geval zullen de dieren dagelijks met prednisolon (2 mg/kg/dag) worden behandeld om het (innate) immuunsysteem te verzwakken. Als dit model in een pilot experiment (module 1) leidt tot (versterkte) klinische verschijnselen kan het model voor deze module worden gebruikt. Als in immuun gecompromitteerde konijnen geen klinische verschijnselen na een infectie met MERS-CoV worden geobserveerd zal alsnog het hier beschreven konijnen model (met een intacte immuun systeem) voor het testen van antivirale interventiestrategieën worden gebruikt zoals beschreven in het oorspronkelijke projectvoorstel.

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

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

Muizen (≥ 5 wk: Roberts, 2005, JVI; Pascal, 2015, PNAS; Tseng, 2007, JVI), fretten (≥ 3 mnd: 10.2.e

[redacted], katten (≥ 8 wk: 10.2.e

[redacted], hamsters (≥ 5 wk, Roberts, 2005, JVI), konijnen (≥ 6 mnd: 10.2.e

Bij muizen kan gebruik gemaakt worden van transgene dieren die ofwel de receptor voor SARS-CoV (ACE2: Tseng, 2007, JVI), ofwel de receptor voor MERS-CoV (huDPP4: Pascal, 2015, PNAS) tot expressie brengen.

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

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

- Hamster – vrouw (model, Roberts, 2005, JVI)
- Muis, wild type coronavirussen
 - Balb/c – vrouw (Subbarao, Roberts)
 - Tg – geen specificatie (Pascal, 2015, PNAS; Tseng 2007)
- Muis, aangepaste coronavirussen
 - Balb/c – vrouw (Day 2009, Roberts 2007)
- Konijn – vrouw (10.2.e [redacted])
- Fret, man/vrouw – 10.2.e [redacted]
- Kat, vrouw – (10.2.e [redacted])

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

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

- Bepaalde keuze van geslacht vanuit wetenschappelijk of regelgevend oogpunt.

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

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

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

Muis (wildtype): 10.1.c

Muis (transgeen): 10.1.c

Fret: 10.1.c

Kat: 10.1.c

Hamster: 10.1.c

Konijn: 10.1.c

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

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

Vermindering: Het ingeschatte aantal dieren is gekozen aan de hand van op virologische studies beschreven statistische analyses van werkzaamheidsstudies, waarin een groepsgrootte van [] adequaat wordt geacht om 1 log₁₀ verschillen in virale load significant te kunnen bepalen (Overbaugh, 2005, JVI). Indien uit studies uit te voeren in het huidige project blijkt dat, bv. door beperkte spreiding in de uitkomsten, met minder dieren evengoed robuuste resultaten te behalen zijn zal dit voortschrijdende inzicht gebruikt worden voor het opstellen van werkprotocollen waarin deze vermindering concreet gemaakt wordt. Tevens zijn in Modules 4 en 5, die gebruikt worden om de toedieningsschema's van de antivirale preparaten op te zetten, go/no-go momenten ingebouwd die gebruikt worden om te bepalen of de uit te testen preparaat/preklinisch model combinatie geschikt is om werkzaamheidsstudies uit te voeren.

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

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

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

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

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

n.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

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

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak is de coronavirusinfectie. Tweemaal daags intramusculaire toediening van prednisolon voor IC konijnen.

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

Tweemaal daags observatie van de dieren vanaf infectie. De observatiefrequentie zal verhoogd worden indien nodig, mochten observaties daartoe aanleiding geven. Er zijn humane eindpunten gedefinieerd, zie J. Zoveel als mogelijk zal er geprobeerd worden om de prikplek te variëren en zo het ontstaan van hematomen bij IC konijnen te voorkomen.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

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

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

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

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

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

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

Er zijn vooralsnog geen andere symptomen te verwachten.

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

Gepubliceerde coronavirusinfecties in katten, hamsters en konijnen verlopen zonder klinische verschijnselen. In fretten is bij SARS-CoV infecties in 50% van de dieren lethargie gerapporteerd (10.2.e). In jonge inteeltmuizen verloopt de SARS-CoV infectie eveneens asymptomatisch. In oude (12 mnd) Balb/c muizen zijn klinische verschijnselen als opstaande haren, gewichtsverlies (< 10%) en lichte dehydratie gerapporteerd (Roberts, 2005, JVI). In huDPP4 knock-in muizen die voor MERS-CoV infecties gebruikt worden verloopt de infectie zonder manifestatie van klinische verschijnselen (Pascal, 2015, PNAS). Samenvattend lijkt de kans op het bereiken van de humane eindpunten in deze modellen zeer klein (<5%). In ACE2 transgene muizen geïnfecteerd met SARS-CoV zijn klinische verschijnselen als >20% gewichtsverlies en mortaliteit gerapporteerd (Tseng, 2007, JVI). In dit model is de inschatting dat in de werkzaamheidsstudies dan ook waarschijnlijk ~50% een humaan eindpunt zal bereiken. In het geval dat er studies uitgevoerd worden met aan de muis geadapteerde virusstammen afkomstig uit Module 2 is het gezien eerdere publicaties van soortgelijke experimenten aannemelijk dat afhankelijk van de dosering >20% gewichtsverlies binnen 3-5 dagen kan optreden. Ook in dit model is de inschatting dat waarschijnlijk ~50% een humaan eindpunt bereiken. Immun gecompromitteerde konijnen kunnen na infectie met MERS-CoV verhoogd last van ademhalingsproblemen vertonen. Daarom is ook de kans op het bereiken van de humane eindpunten hoger. Het is echter onbekend of immuun gecompromitteerde konijnen klinische verschijnselen na infectie met MERS-CoV zullen vertonen en wat het daarmee geassocieerde ongerief zal zijn. In een pilot experiment (module 1) zal daarom aandacht worden besteed aan de observatie van de dieren, het optreden van klinische verschijnselen en het bereiken van de humane eindpunten. Voor studies van nog onbekende coronavirussen (bv. isolaten van een toekomstige uitbraak) is een inschatting op voorhand niet te maken. De informatie hiervoor zal verkregen worden in studies uitgevoerd in Modules 1 t/m 3 en bij indienen van de werkprotocollen zal deze informatie met de IvD gedeeld worden. De ervaring van de aanvrager met respiratoire infecties in de modeldieren en de heldere humane eindpunten dragen bij aan een minimalisatie van het op te treden ongerief. De kans op het optreden van de algemene humane eindpunten (4 en 5) wordt zeer klein geacht, $\leq 1\%$.

K. Classificatie van ongerief

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

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

De beschreven HEP's voor modellen met klinische verschijnselen verminderen het optreden van ernstig ongerief, maar 100% garantie op het voorkomen ervan is niet af te geven. Kortdurend ernstig ongerief in modellen met klinische symptomen (fretten, IC konijnen, ACE2 Tg muizen, Balb/c muizen in enkele modellen) is dan ook niet uit te sluiten maar dit zal tot een minimum beperkt worden door verhoogde observatiefrequentie wanneer dit noodzakelijk wordt geacht. Voor deze modellen kan voor een deel van de dieren (zie ook J) het maximale cumulatieve ongerief dan ook als ernstig worden ingeschaald. De

beschreven HEP's zijn van toepassing op infecties met virussen die impact hebben op het respiratoire systeem van de verschillende diermodellen, zoals voor de bekende SARS/MERS modellen, maar ook voor bv. infectiemodellen voor hoogpathogene influenzavirussen. Met al deze modellen heeft de aanvrager veel ervaring, waardoor nauwkeurige ongeriefinschatting en bepaling van het bereiken van HEPs in de experimenten gewaarborgd is. Door het potentieel beschermend effect van de antivirale behandeling worden echter minder dieren met ernstig ongerief verwacht in vergelijking met modules 1 en 3. Voornamelijk de dieren in de controle groep hebben een verhoogd kans op ernstig ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

10.2.e

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 4 februari 2020 15:27
Aan: Kasbeheer
Onderwerp: factuur AVD277002015283-3
Bijlagen: Factuur wijziging AVD277002015283-3.pdf

16

Beste collega's,

In de bijlage tref je factuur AVD277002015283-3.

Graag verwerken.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

Postbus 93118
2509 AC Den Haag

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

Van: Info-zbo
Aan: "IvD@viroclinics.com"
Cc: 10.2.e
Onderwerp: Ontvangstbevestiging wijziging AVD277002015283-3
Datum: dinsdag 4 februari 2020 15:28:23
Bijlagen: [Ontvangstbevestiging wijziging AVD277002015283-3.pdf](#)

Geachte 10.2.e,

In de bijlage treft u de ontvangstbevestiging van uw wijziging aan, waarnaar wij gemakshalve naar verwijzen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Viroclinics Biosciences B.V.
t.a.v. 10.2.e
Marconistraat 16
3029 AK Rotterdam

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD277002015283-3

Datum 4 februari 2020
Betreft Ontvangstbevestiging Wijziging projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte 10.2.e,

Wij hebben op 4 februari 2020 een wijziging ontvangen op uw projectvergunning dierproeven. Het gaat om uw project "Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen" met aanvraagnummer AVD277002015283. Uw wijziging is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD277002015283-3.

Wacht met het doorvoeren van de wijziging

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw wijziging. Als wij nog informatie nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u de wijzigingen doorvoeren in uw project.

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage: - Factuur



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Viroclinics Biosciences B.V.
t.a.v. 1020
Marconistraat 16
3029 AK Rotterdam

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD277002015283-3

Factuur

Factuurdatum 04 februari 2020
Vervaldatum 05 maart 2020
Factuurnummer 152833
Betreft Factuur Wijziging projectvergunning dierproeven

Omschrijving

Bedrag

Betaling leges projectvergunning dierproeven
Betreft wijziging AVD277002015283-3

€ 1389,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL 29 INGB 070.50.01.512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93118, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: 10.2.e en 10.2.g
Aan: "Info-zbo"
Onderwerp: RE: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD277002015283-3
Datum: dinsdag 4 februari 2020 16:09:20

20

Geachte CCD,

We hebben uw verzoek om advies over wijzigingsaanvraag AVD277002015283-3 in goede orde ontvangen.

We gaan zoals besproken dit verzoek z.s.m. bespreken zodat het advies uiterlijk 17 februari naar u gestuurd kan worden i.v.m. bespreking in de CCD vergadering van 21 februari a.s.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Van: Info-zbo

Verzonden: dinsdag 4 februari 2020 15:35

Aan: 10.2.e

Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningsaanvraag AVD277002015283-3

19

Geachte leden van DEC 10.2.e

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen" aanvraagnummer: AVD277002015283-3.

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

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

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

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 04 februari 2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegeande per e-mail aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groeten,

CCD

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.

Van: 10.2.e
Aan: "IvD@viroclinics.com"
Cc: 10.2.e
Onderwerp: Vervolg wijziging AVD277002015283-3
Datum: dinsdag 4 februari 2020 15:41:26
Bijlagen: DEC-advies opgevraagd AVD277002015283-3.pdf

Geachte 10.2.e,

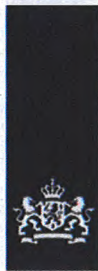
In de bijlage treft u het vervolg van uw wijziging betreft AVD277002015283-3.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Viroclinics Biosciences B.V.
t.a.v. 10.2.e
Marconistraat 16
3029 AK Rotterdam

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD277002015283-3

Datum 04 februari 2020
Betreft Vervolg Wijziging projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e,

Op 4 februari 2020 hebben wij uw wijziging voor een projectvergunning Dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen" met aanvraagnummer AVD277002015283-3.

DEC advies gevraagd

Uw aanvraag is naar DEC 10.2.e en 10.2.g gestuurd. Zij zal hierover advies aan de CCD uitbrengen. Als de DEC vragen heeft, zal zij contact met u opnemen.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend

10.2.e

Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: maandag 17 februari 2020 15:26
Aan: 10.2.e
Onderwerp: FW: 10.2.e en 10.2.g advies wijzigingsaanvraag AVD277002015283-3

25

Hoi 10.2.e

Er is een nieuw DEC-advies binnen. Volgens mij is dit de spoedaanvraagwijziging als ik mij niet vergis.

Groeten 10.2.e

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 17 februari 2020 15:25
Aan: 10.2.e en 10.2.g Info-zbo
CC: 10.2.e
Onderwerp: RE: 10.2.e en 10.2.g advies wijzigingsaanvraag AVD277002015283-3

24

Beste 10.2.e,

De stukken en het advies zijn in goede orde ontvangen. Hartelijk dank hiervoor.

Groeten 10.2.e

Van: 10.2.e en 10.2.g
Verzonden: maandag 17 februari 2020 10:26
Aan: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
CC: 10.2.e
Onderwerp: 10.2.e en 10.2.g advies wijzigingsaanvraag AVD277002015283-3

23

Geachte CCD,

Hierbij ontvangt u, naar aanleiding van uw verzoek, van 10.2.e en 10.2.g het advies en definitieve wijzigingsaanvraag AVD277002015283-3.

Met vriendelijke groet,

10.2.e
10.2.e en 10.2.g

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. 10.2.e en 10.2.g 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. 10.2.e en 10.2.g accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

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.

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.

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD277002015283

Dit project is oorspronkelijk aangevraagd door BioXpert onder het nummer AVD905002015283. Op het moment dat BioXpert ophield te bestaan is dit project overschreven naar Viroclinics B.V. die zelf vergunninghouder is geworden. Het heeft toen een nieuw nummer gekregen AVD277002015283. Dit advies heeft betrekking op de 3^e wijziging van dit project. De hierop betrekking hebbende tekst is in Bold weergegeven.

2. Titel van het project: Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen.

3. Titel van de NTS: Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen.

4. Type aanvraag:

- X nieuwe aanvraag projectvergunning
- X wijziging van vergunning met nummer AVD905002015283
- X **wijziging(3) vergunning met nummer AVD27700201528-3**

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: 10.2.e en 10.2.g
- telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e en 10.2.g
- mailadres contactpersoon: 10.2.e en 10.2.g

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- X ontvangen door DEC: 17-11- 2015
- X aanvraag compleet: 17-11-2015
- X in vergadering besproken: 02-12-2015 en 13-01-2016
anderszins behandeld
termijnonderbreking(en) van / tot
besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met
maximaal 15 werkdagen
- X aanpassing aanvraag: 06-01-2016 en 04-02-2016
- X advies aan CCD: 08-02-2016

Wijziging:

- X ontvangen door DEC: 20-11-2016

X in vergadering besproken: 30-11-2016

X aanvraag compleet: 20-03-2017

X in vergadering besproken: 27-03-2017

X advies aan CCD: 05-04-2017

Wijziging(3)

X ontvangen door DEC: 03-02-2020

X anderszins behandeld: schriftelijke rondes gestart op 04-02-2020 en op 10-2-2020

X aanvraag compleet: 14-02-2020

in vergadering besproken: n.v.t.

X advies aan CCD: 17-02-2020

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

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 06-12-2015 en 19-01-2016

- Strekking van de vragen:

De correspondentie d.d. 06-12-2015 had betrekking op:

- o De beschrijving en onderbouwing van de strategie voor de keuze van een bepaald diermodel in het geval van (varianten op) reeds bekende coronavirussen (SARS, MERS), alsmede voor het ontwikkelen van diermodellen in het geval van een nieuw coronavirus. Verheldering van de bijgevoegde flowchart.
- o Toelichting in hoeverre gewaarborgd kan worden dat gekozen wordt voor het diermodel met het minste ongerief.
- o Criteria waaraan een coronavirus moet voldoen om een bepaald traject/model te kiezen.
- o Toelichting of er één of meerdere diermodellen worden gebruikt voor het testen van één preparaat. Nadere onderbouwing in geval er voor het testen van één preparaat meerdere diermodellen worden gebruikt.
- o Onderbouwing van de aantallen groepen, aantallen dieren en aantallen experimenten.
- o Beschrijving van dose-finding studies in niet-symptomatische modellen en de daarbij te hanteren criteria voor het bepalen van de virusload.
- o Toelichting en onderbouwing van de keuze voor gastheer-adaptatie van het virus bij muizen. Toelichting van de te volgen strategie als het niet

mogelijk blijkt het virus aan de muis te adapteren. Beschrijving van de experimentele procedures bij gastheer-adaptatie.

- Vermelding van en toelichting op het geslacht en de gekozen levensstadia van de te gebruiken dieren.
 - Beschrijving van het verwachte tijdstip van het optreden van klinische verschijnselen. Afstemmen van de observatiefrequentie op de te verwachten klinische verschijnselen en het verloop daarvan.
 - Differentiëren van de inschatting van het ongerief naar ongeriefsklasse en naar diersoort; vermelding van het geschatte percentage van de dieren waarop een bepaalde ongeriefsklasse van toepassing is.
 - Beschrijving van en toepassing van de humane eindpunten, telkens toegespitst op het desbetreffende type dierproef en in het bijzonder in het geval van een nieuw coronavirus.
 - Redactionele aspecten: Nader verduidelijken dan wel toespitsen van diverse tekstpassages en een logische en consequente opname van tekstpassages bij de desbetreffende (sub)hoofdstukken in elk formulier. Gebruik van vaktaal en moeilijk taalgebruik in de NTS.
- De correspondentie d.d. 19-01-2016 had betrekking op:
 - Helderder beschrijving van criteria die worden gehanteerd bij de keuze van het diermodel en een toelichting in hoeverre de mate van de verwachte welzijnsaantasting hierbij een rol speelt.
 - Toevoegen van de ontbrekende flowchart.
 - Helderder beschrijving en onderbouwing voor de keuze van het geslacht en van de leeftijd van de dieren.
 - Redactionele aspecten: Nader verduidelijken dan wel toespitsen van diverse tekstpassages, duidelijk gebruik van bepaalde termen (vaktaal). Aandacht voor correcte beschrijving van de verwachte welzijnsaantasting per diersoort en consequent doorvoeren daarvan in alle formulieren.
 - Datum antwoord: 06-01-2016 en 04-02-2016

Correspondentie met de aanvrager over de wijziging:

- Datum: 05-12-2016
- Strekking van de vragen:

De correspondentie d.d. 05-12-2016 had betrekking op:

- o De rationale voor een te ontwikkelen immuun gecompromitteerd model met ziekteontwikkeling na challenge met MERS-CoV
 - o Duidelijke onderbouwing van de aantallen dieren gemoeid met de pilot en de vervolgstudies, en hoe deze samenhangen
 - o De dosering (schema en toedieningsroute) van prednisolon
- Datum antwoord: 20-03-2017

Correspondentie met de aanvrager over de wijziging(3):

- **Datum: 9-02-2020**

- **Strekking van de vragen:**

De correspondentie d.d. 9-02-2020 had betrekking op:

- o **De zeer aanzienlijke uitbreiding van het aantal experimenten, het aantal groepen per experiment en het aantal dieren per groep in bijlage 6 van de aanvraag.**
 - o **De keuze van de diermodellen.**
 - o **Het te verwachten ongerief.**
 - o **Maatregelen om in deze situatie duplicering van experimenten zoveel mogelijk te voorkomen.**
 - o **Aansluiting NTS op gevraagde wijzigingen.**
- **Datum antwoord: 10-02-2020**

- **Datum: 12-02-2020**

- **Strekking van de vragen:**

De correspondentie d.d. 12-02-2020 had betrekking op:

- o **Het aantal groepen per experiment en het aantal dieren per groep in bijlage 6 van de aanvraag.**
 - o **De keuze van de genetisch gemodificeerde diermodellen. (oa is er sprake van aangetast fenotype)**
 - o **Aansluiting NTS op projectbeschrijving en de gevraagde wijzigingen.**
- **Datum antwoord: 14-02-2020**

9. Strekking van het de antwoorden: De vragen en opmerkingen van de DEC zijn naar tevredenheid beantwoord; aanvraag na bijstelling volledig en duidelijk.

De antwoorden op de vragen bij de wijziging waren duidelijk beantwoord en ook verwerkt in de relevante aanvraagdocumenten.

Strekking van de antwoorden: De vragen en opmerkingen van de DEC zijn naar tevredenheid beantwoord; aanvraag na bijstelling volledig en duidelijk.

10. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de wijziging.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de wijziging(3).

11. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t., de DEC beschikt zelf over de relevante expertise.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

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

In de afgelopen 15 jaar zijn er uitbraken geweest van nieuwe zgn. SARS en MERS coronavirussen, met hoge sterftepercentages als gevolg. Van de geïnfecteerde mensen overleed 10% tot 40%. Naast grote gevolgen voor de gezondheid van de geïnfecteerde mensen, hadden deze uitbraken een enorme impact op de economie, met name in de Aziatische landen.

Deze coronavirussen werden vanuit dieren overgedragen op mensen, waarna overdracht van mens-op-mens de uitbraak verergerde. Door toepassing van